Untersuchungen zur Trennung der DNA-Ketten von Adenoviren unterschiedlicher Onkogenität und ihres Transkriptionsmodus

Martina M.C. Landgraf-Leurs

1972

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. Max EDER

UNTERSUCHUNGEN ZUR TRENNUNG DER DNA-KETTEN VON ADENOVIREN UNTERSCHIEDLICHER ONKOGENITÄT UND IHRES TRANSKRIPTIONSMODUS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martina M.C. Landgraf-Leurs

aus

Weesp/Holland

1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Hartmut Rabes
Mitberichterstatter: Professor Dr. Max Eder
Dekan: Professor Dr. Wolfgang Span
Tag der mündlichen Prüfung: November und Dezember 1972

Mein Dank gilt

Herrn Prof.Dr.H. Rabes für die Ermöglichung dieser Arbeit und seine Geduld bei der Lösung zahlreicher Probleme.

Herrn Prof.Dr.M. Green für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Prof.Dr.P.H. Hofschneider für seine Bereitschaft zum kritischen Durchlesen dieser Arbeit.

July Lehoczy und John Richardson für ihre ausgezeichnete technische Assistenz.

Fides Haag für die Herstellung der photographischen Abbildungen.

Unterstützung wurde von der U.S. Public Health Service, Grant AI-01725 und von dem NIH National Cancer Institute, Special Virus Cancer Program, Contract No. PH 43-67-692, U.S.A., erhalten.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGEN	8
EINLEITUNG	9
Fragestellung	12
MATERIAL und METHODEN	13
Nährmedien für Gewebekulturen	13
I. Medien für Suspensionskulturen	13
II. Medium für "Monolayer"-Kulturen	16
III. Medium für "Plaque-Titration"	17
Gewebezüchtung	18
I. Züchtung von KB-Zellen	18
II. Produktion von Adenoviren	19
III. Bereitung von Stammviren	2o
IV. Konzentrationsbestimmung der Adenoviren mittels "Plaque-Titration"	21
V. Züchtung transformierter Zellen	22
VI. Markierung von Adenovirus DNA	22
VII. Markierung der RNA	22
BIOCHEMISCHE METHODEN	23
I. Isolierung und Reinigung von Adenoviren aus infizierten KB-Zellen	23
II. Extraktion von DNA aus Adenoviren	24
III. Denaturierung von Adenovirus DNA durch Hitze oder Alkali und Komplexbildung von DNA mit Polyribonukleotiden	25
IV. Alkalische Hydrolyse der Polyribonukleotide	26
V. Analytische Band-Zentrifugation der Adenovirus DNA-Polyribonukleotid-Komplexe	26
VI. Analytische Äquilibrierungs-Zentrifugation der viralen DNA-Polyribonukleotidkomplexe im Cäsium-Chlorid-Dichte Gradienten	28
VII. Präparative Zentrifugation der DNA-Polyribonukleotid-Komplexe im Cäsium-Chlorid-Dichte-Gradienten	29
VIII. Fixierung von DNA auf Filtern zur Hybridisierung	3o

IX. Extraktion der RNA aus infizierten KB-Zellen oder aus transformierten Ratten-Embryo-Zellen 30

X. DNA-RNA Hybridisierung 32

XI. Elution hybridisierter RNA 33

ERGEBNISSE 34

I. Isolierung der DNA aus Adenoviren 34

II. Bindung von Homopolymeren an denaturierte Adenovirus-DNA 35

III. Bindung von G-enthaltenden Copolymeren an denaturierte Ad 2, 7 und 12 DNA 38

IV. Präparative Trennung der komplementären Ad 2 und 7 DNA Ketten 48

V. Hybridisierung viraler RNA mit getrennten Ad 2 DNA Ketten 56

DISKUSSION 64

I. Bindung von Homo-Ribopolymeren an denaturierte Adenovirus-DNA 64

II. Bindung von Co-Ribopolymeren an denaturierte Adenovirus-DNA 64

III. Vergleich der Bindung verschiedener Poly (u,G) Präparationen an Ad 2, 7 und 12 DNA Moleküle 65

IV. Präparative Trennung der Adenovirus DNA Ketten 65

V. Transkription der getrennten Adenovirus 2 DNA Ketten 66

ZUSAMMENFASSUNG 71

LITERATURVERZEICHNIS 73

LEBENSLAUF 77

ABKÜRZUNGEN

A,dA	Adenosin, desoxy-Adenosin
C,dC	Cytosin, desoxy-Cytosin
G	Guanidin
U	Uridin
I	Inosin
dT	desoxy-Thymidin
Ad	Adenovirus Typ
Ad 2 HEK_4 Ad 7 GR M 76-3 Ad 12 Mg 8-3 bis 5 Huie	Bezeichnungen, unter welchen diese Adenoviren beim NIH und dem "Molecular Virology Institute", St.Louis, registriert sind
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	DNA spaltendes Enzym
E.D.T.A.	Äthylen-diamin-tetraessigsäure
H-Kette, L-Kette	schwere, bzw. leichte DNA Kette, womit die höhere, bzw. niedrigere Poly (U,G)-Bindungskapazität dieser Kette zum Ausdruck kommen soll
KB-Zellen	Ephitheliale menschliche Tumorzellen, die 1955 von Eagle aus einem Karzinom des Nasopharynx isoliert wurden (38)
M.E.M.	Minimales Essentielles Medium
"Monolayer"	Einzelschicht
N.I.H.	National Institute of Health
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung, die pro Liter 8 g NACl-o,2 g KCl-o,1 g $CaCl_2$-o,1 g $MgCl_2.6H_2O$-1,15 g Na_2HPO_4 und o,2 g KH_2PO_4 enthält
P.F.U.	"plaque forming unit" (Aufhellung verursachende Einheit, s.Gewebszüchtung II,4)
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	RNA spaltendes Enzym
ρ	Dichte
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
"self annealing"	Inkubation einer Kette-Präparation in 5-6 M CsCl 4 Std. bei 37°C
SSC	o,15 M NaCl - o,o15 M Na_3Citrat
SV 4o	Simian Virus 4o
UV	Ultra-Violettes Licht

EINLEITUNG

Seit ROUS 1911 (1) entdeckte, daß Viren in Hühnern Tumoren verursachen, ist die virale Ursache von Tumoren bei Tieren und beim Menschen Mittelpunkt ausführlicher Untersuchungen. So konnten z.B. in Burkitt Lymphomen bei Negern in Zentralafrika Herpesviren nachgewiesen werden (2,3). Diese Tatsache beweist natürlich nicht, daß diese Viren mit der Entstehung des Tumors ursächlich verknüpft sind. Kenntnis von Aufbau und Struktur tierischer Viren und ihres Zusammenwirkens mit tierischen Zellen sind Voraussetzungen für das Studium der viralen Krebsgenese. Es ist jetzt möglich, in Zellkulturen Viren zu züchten und sie zu isolieren, bzw. ihre DNA und RNA zu extrahieren.

Man kann drei verschiedene Möglichkeiten der Interaktion zwischen Virus und Zelle unterscheiden:

1. Die Zelle ist unempfindlich für ein Virus, z.B. weil keine Virusrezeptoren in der Zellmembran vorhanden sind (4,5).
2. Die Zelle ist empfindlich für ein Virus. Dabei kommt es in der Zelle zur Virusvermehrung, wobei die Duplikationsgeschwindigkeit der Virus-DNA meistens größer ist als die der Zell-DNA. Durch den Vermehrungsprozeß der Viren können die Zellfunktionen so geschädigt werden, daß diese lysieren und Viruspartikel frei werden. Diese Form der Zell-Virus-Interaktion findet man häufig bei akuten Viruserkrankungen. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß Virusreplikation ohne Zelldestruktion stattfindet.
3. Die Zelle wird durch ein Virus transformiert. Dabei wird die virale "Erbmasse" in die Zelle so integriert, daß sie sich nicht selbständig multiplizieren kann, sondern abhängig bleibt von der DNA-Replikation der Wirtszelle. In der transformierten Zelle kommen nur einige Funktionen der viralen DNA zum Ausdruck. Man findet solche Funktionen, die früh im Infektionszyklus ablaufen. Späte Funktionen, wie

z.B. die Synthese von Mantelproteinen, werden nicht realisiert. Dies bedeutet jedoch nicht, daß das integrierte Virusgenom unvollständig ist. So ist z.B. gezeigt worden, daß aus virusfreien Zellen, die durch SV 4o transformiert worden waren, Viren isoliert werden konnten, wenn transformierte Zellen mit sensiblen "Indikatorzellen" zusammengezüchtet wurden (6,7). - Die von Adenoviren induzierten Tumoren enthalten ebenfalls keine vollständigen Viren. Der Nachweis von virusspezifischen Tumorantigenen und m-RNA-Molekülen (transformierte m-RNA) (8 - 12) macht jedoch die Integration von zumindest einem Teil viraler Erbmasse in transformierten Zellen wahrscheinlich. Im Gegensatz zu SV 4o transformierten Zellen ist die Gewinnung infektiöser Viren aus durch Adenoviren transformierten Zellen noch nicht gelungen (13,14). Der Grund dafür liegt vielleicht an dem Fehlen der passenden "Indikator-Zelle" oder an dem Einbau nur eines Teiles der Adeno-Erbmasse in die transformierten Zellen.

Die Tumor-induzierenden Viren können in RNA- und DNA-enthaltende Viren eingeteilt werden. Zu den RNA-Tumorviren gehören die Vogel-Leukaemie- und -Sarkomviren, die Mäuse-Mammatumor-Viren und die verschiedenen vor kurzem entdeckten Leukaemie- und Sarkomviren der Katze und Ratte, sowie des Hamsters und Meerschweinchens. Das Auffallendste dieser Viren ist, daß die Erbmasse aus RNA besteht und daß diese Viren ein Polymerase-Enzymsystem besitzen, das RNA als Matritze zur Transcription von DNA benützt (15-19). Die mögliche Rolle dieser Virén bei der Krebsentstehung im Menschen wurde von HUEBNER diskutiert (2o,21).

Es sind vier Gruppen von DNA-Viren bekannt, die onkogene Subgruppen enthalten: Polyoma-, Papilloma-, Adeno- und möglicherweise Herpes-Viren.

Adenoviren wurden zum Studium von Infektions- und Transformationsprozessen gewählt, weil sie: Erstens Subgruppen um-

fassen, die nicht, schwach und stark onkogen sind; zweitens bereits gut morphologisch und biochemisch charakterisiert sind und drittens gut in Gewebszüchtung wachsen.

Es wurden 31 Typen von Adenoviren beschrieben, die sich in menschlichen Zellen gut, in tierischen Zellen jedoch weniger gut multiplizieren. Außerdem gibt es 18 von Affen, drei vom Rind und je ein vom Kaninchen, der Maus und den Vögeln isolierte Typen (22). Die "humanen" Typen verursachen in ihrem natürlichen Wirt, dem Menschen, u.a. respiratorische Infektionen, wie Pharyngitis und Conjunktivitis.

Von den humanen Adenovirustypen sind Typ 12 (23), Typ 18 (24) und Typ 31 (25) im Hamster stark onkogen: Werden nämlich Hamster gleich nach der Geburt mit einem dieser Typen infiziert, so entstehen innerhalb von 1 1/2 bis 3 Monaten schnell wachsende, undifferenzierte Sarkome, die sich ohne Schwierigkeiten transplantieren lassen.
Weiterhin sind Typ 3 (26), Typ 7 (27), Typ 14, 16 und 21 (28) als schwach onkogen beschrieben. Diese Viren rufen in Hamstern nur in einem geringeren Prozentsatz und mit größerer Latenzzeit Tumoren hervor.
Von den übrigen Typen sind 1,2,5 und 6 nicht imstande, in Hamstern Tumoren zu induzieren, können jedoch in der Gewebekultur Rattenembryozellen transformieren (28).
Diese Einteilung der Adenoviren in stark, schwach und nicht onkogene Viren konnte weiter untermauert werden. Man fand z.B. eine übereinstimmende Basenkomposition der DNA in den Typen einer Gruppe (29), gleichartige Haemagglutination von Ratten und Rhesusaffen-Erythrozyten (24) und verwandte Tumorantigene (28). Außerdem ist der GC-Gehalt der DNA hoch (55-61 %) in nicht onkogenen Adenoviren, niedriger (5o-52 %) in schwach onkogenen und am niedrigsten (48-49 %) in den stark onkogenen Viren (29).

Fragestellung:

Die DNA-enthaltenden humanen Adenoviren stellen sehr gute Systeme für Studien über die Relation zwischen viraler DNA-Topologie und der Regulation der Transkription dar. Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Trennung der Adeno-DNA-Ketten beschrieben. Die unterschiedliche Bindbarkeit synthetischer Polyribonucleotide an komplementäre DNA-Ketten von Bakteriophagen-DNA macht eine präparative Trennung dieser Ketten als Komplex mit diesen Ribopolymeren möglich (31). Dieses Trennverfahren war Voraussetzung für das Studium der Transkription von m-RNA von den zwei getrennten DNA-Ketten (31). Dabei ergab sich eine Korrelation zwischen Umfang der Transkription einer DNA-Kette und ihrer Fähigkeit G-reiche Ribopolymere zu binden. Man vermutete deshalb, daß dC-reiche Gruppen in der DNA-Kette eine entscheidende Rolle bei der Initiation der RNA-Transkription spielen (32-34).
Ähnliche Studien mit tierischen Viren sind bisher nicht publiziert worden. KUBINSKI und ROSE (35) konnten zeigen, daß denaturierte Adenovirus DNA mit Poly (I,G) bei der analytischen Ultrazentrifugation zwei getrennte Banden formte, die beide eine größere Dichte als denaturierte DNA hatten. Daraus folgerten die Autoren, daß Poly (I,G) mit DNA reagiert und daß die beiden Banden wahrscheinlich die zwei komplementären Virus-DNA-Ketten darstellen.
Wir studierten die Bindung von Homo- und Copolymeren an die komplementären DNA-Ketten von Adenoviren Typ 2,7 und 12, also je einem Vertreter eines nicht, schwach, bzw. stark onkogenem Virustyp. Die Charakterisierung der zwischen verschiedenen Polyribonukleotiden und Adenovirus DNA gebildeten Komplexe erfolgte mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge. Die intakten komplementären Virus-DNA-Ketten wurden in CsCl-Dichtegradienten durch präparative Ultrazentrifugation getrennt.

Der zweite Teil dieser Arbeit befaßt sich mit der Transkription von Adenovirus-m-RNA von den getrennten DNA-Ketten. Man unterscheidet drei Arten von m-RNA: sog. frühe und späte m-RNA in virusproduzierenden Zellen und transformierte m-RNA in virustransformierten Zellen.
Die Rolle der individuellen DNA-Ketten in den verschiedenen Stadien der Infektion (früh-spät) und in transformierten Zellen wurde studiert und der Möglichkeit einer Relation zwischen der Transkription verschiedener Ketten und dem Auftreten einer produktiven Infektion oder einer Transformation nachgegangen.
Zwei Modelle, die die Transkription der viralen m-RNA von Adeno-DNA illustrieren, werden diskutiert.

MATERIAL und METHODEN

Nährmedien für Gewebekulturen

I. Medien für Suspensionskulturen von KB-Zellen und transformierten Ratten-Embryo-Zellen:

A. Minimales essentielles Medium (M.E.M.) nach EAGLE (36):
Nachfolgende konzentrierte Stamm-Lösungen wurden bereitet:
1) "Rührflaschen"-Salzlösung A (1o-fach konzentriert)

	Gramm
NaCl	136
KCl	8
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	3o
Dextrose	2o
$NaHCO_3$	4o

Die genannten Substanzen wurden in dreifach destilliertem Wasser bis zum Endvolumen von 2 l gelöst.

2) "Rührflaschen"-Salzlösung B (1oo-fach konzentriert)
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 2o g/l tridest.

3) Essentielle Aminosäuren (2o-fach konzentriert)

	Gramm
l-Arginin	25,3
L-Cystin	4,8
l-Histidin-HCl	8,3
l-Isoleucin	1o,4
l-Lysin-HCl	14,6
l-Methionin	3,o
l-Phenylalanin	6,4
l-Threonin	9,6
l-Tryptophan	2,o
l-Tyrosin	7,2
l-Valin	9,2
l-Leucin	1o,4

Die aufgeführten Substanzen wurden in 2 l Aq.tridest. und 8o ml konzentrierter HCl gelöst und mit Aq.tridest. auf ein Endvolumen von 1o l gebracht. Die Lösung wurde durch ein Millipore-Filter (Porengröße o,22 μ) filtriert und schließlich bei 4°C. aufgehoben.

4) Die nicht essentiellen Aminosäuren (1oo-fach konzentriert

	Gramm
l-Alanin	1,78
l-Asparagin	2,64
l-Asparaginsäure	2,66
l-Glutaminsäure	1,5o
l-Serin	2,1o
l-Prolin	2,3o

wurden bis auf ein Endvolumen von 1 l in Aq.tridest. gelöst.

5) Folgende Vitamine (1oo-fach-konzentriert) wurden in 1 l Aq. tridest. gelöst:

	Milligramm
Nicotinamid	24
Pyridoxal-HCl	41

	Milligramm
Thiamin-HCl	67
Riboflavin	8
Calcium-Pantothenat	48
Cholin-Chlorid	28o
Inositol	1o8

Fünf mg Biotin wurden in 5,4 ml o.1 N NaOH gelöst und 88 mg Folsäure wurden hinzugefügt. Schließlich wurde die Vitaminlösung mit Aq.tridest. auf ein Endvolumen von 2 l gebracht.

6) Antibiotika, Phenolrot und Glutamin:

Phenolrot	8o mg
Penicillin	3 g
Streptomycin	1 g
Glutamin	1o g

wurden in 112o ml Aq.tridest. gelöst.

Von den oben genannten Stamm-Lösungen, 1 - 6, wurden folgende Mengen gemischt, um das Medium für Suspensionskulturen zu bereiten:

	ml
Salzlösung A	16oo
Salzlösung B	16o
essentielle Aminosäuren	8oo
nicht essentielle Aminosäuren	16o
Vitamine	16o
Antibiotika, Phenolrot und Glutamin	112o
Aq.tridest.	ad 12ooo

Das Medium wurde durch Millipore-Filter (Porengröße o,22 µ) filtriert und nach Hinzufügen von 4 ml Fungizon (16,3 mg) (E.R.Squibb und Söhne, New York) bis zu 6o Tage bei 4°C aufgehoben.
Pferdeserum bis zu einer Konzentration von 5 % wurde vor Gebrauch dem Medium hinzugefügt.

B. Dehydriertes, minimales essentielles Medium.
Ein käufliches dehydriertes Medium (General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio oder Grand Island Biological Co., Grand Islands, N.Y.) wurde ebenfalls benutzt. Die Zusammensetzung dieses Mediums gleicht dem oben beschriebenen Medium; die nicht essentiellen Aminosäuren fehlen jedoch.

II. Medium für "Monolayer" Kulturen (Einschichtkulturen) von KB-Zellen:
Nachfolgende Stammlösungen wurden bereitet:
1) "Monolayer"-Salz-Lösung A (1o-fach konzentriert)

	Gramm
NaCl	136
KCl	8
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2,8
$NaHCO_3$	4o
Dextrose	2o

Die Substanzen wurden in Aq.tridest. bis zu einem Endvolumen von 1 l gelöst.

2) Für "Monolayer"-Salz-Lösung B (1oo fach konzentriert) wurden

	Gramm
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	2o
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	37,7

in Aq.tridest. ad 1 l gelöst.

3) Die Stammlösungen für essentielle Aminosäuren (2o-fach konzentriert), nicht essentielle Aminosäuren (1oo-fach konzentriert) und Vitamine (1oo-fach konzentriert) wurden wie unter I A beschrieben, bereitet.

4) Antibiotika, Phenolrot und Glutamin:

Phenolrot	8o mg
Penicillin	5 g

Streptomycin	2 g
Neomycin	1 g
l-Glutamin	1o g

wurden in 112o ml Aq.tridest gelöst.

Von den oben genannten Stamm-Lösungen wurden nachfolgende Volumina gemischt, um das "Monolayer"-Medium herzustellen:

	ml
"Monolayer" Salzlösung A	16oo
"Monolayer" Salzlösung B	16o
essentielle Aminosäuren	8oo
nicht essentielle Aminosäuren	16o
Vitamine	16o
"Monolayer"-, Antibiotika-, Phenolrot-, Glutamin-Gemisch	112o
Aq.tridest ad	12ooo

Das Medium wurde durch Filtration sterilisiert und nach Hinzufügen von 4,o ml Fungizon-Lösung (16,3 mg) bei 4°C aufgehoben.
Kalb-Serum bis zu einer Konzentration von 1o % wurde dem Medium vor Gebrauch hinzugefügt.

III. Medium für "Plaque-Titration":
Dieses Medium wurde in zweifacher Konzentration hergestellt.

1) Basismedium:	ml
Earle's Salzlösung (1o-fach konzentriert)	2o,o
Aminosäuren (1oo-fach konzentriert)	2,o
Vitamine und l-Glutamin (1oo-fach konzentriert) (käuflich: ME.M., MA 13-6o7)	4,o
2,1 % Arginin	o,7
1 N NaOH	o,4
Pferde-Serum	12,o
Hühner-Serum (nativ)	12,o
Aq.tridest	67,o

$NaHCO_3$ 1o g

Diese Substanzen wurden aseptisch in sterilisiertem Wasser gelöst (Endvolumen 2oo ml).

2) Antibiotika-Gemisch:

Penicillin	6 x $1o^6$ Einheiten
Streptomycin	2 g
Neomycin	1 g
Fungizon	o,1 g

2 ml von diesem Gemisch wurden 2oo ml Basismedium zugefügt.

3) 1,8 prozentige "weiße" Agar-Suspension: 1,8 Bacto-Agar wurde in 1oo ml Aq.tridest suspensiert und die Suspension wurde autoklaviert.

4) 1,8 prozentiger "roter" Agar:
Zuerst wurde eine Neutralrot-Lösung bereitet: Dazu wurden o,2 g Neutralrot in 23oo ml Aq.tridest gelöst. Dann wurden 1,8 g Bacto-Agar in 1oo ml Neutralrot-Lösung suspendiert und die Suspension autoklaviert.
Zur Bereitung des Nähragars für die "Plaque Titration" wurde ein Teil des Mediums bei 45°C mit einem Teil des weißen oder roten Agars gemischt (37).

Gewebezüchtung

Bei allen Züchtungsvorgängen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

I. Züchtung von KB-Zellen

KB-Zellen sind epitheliale menschliche Tumorzellen, die 1955 von EAGLE aus einem Karzinom des Nasopharynx isoliert wurden (38). Diese Zellen sind heteroploid. Benutzt wurden KB-Zellen, die sowohl in Suspension als auch als "Monolayer" wachsen können. KB-Zellen, die für die Suspensionskulturen verwendet wurden, erhielt man durch Abkratzen von "Monolayer-Kulturen" mit nachfolgender Resuspension der gewonnenen Zellen.

Die Suspensionskulturen wurden in ein bis vier Liter großen Inkubationsflaschen in M.E.M. mit 5 % Pferdeserum gezüchtet. Sie blieben in Suspension durch einen rotierenden Stabmagneten, der an einer Kette befestigt, vom abschließenden Gummistopfen der Inkubationsflasche in die Suspension tauchte. Die Konzentration der Zellen wurde auf 2-5 x 10^5 Zellen pro ml gehalten, indem täglich frisches Medium zugefügt wurde. Für das Herstellen neuer "Monolayers" wurden Suspensions-Zellen durch Zentrifugation konzentriert und nach Resuspension in M.E.M. mit 0,1 mM $CaCl_2$ und 10 % Kalb-Serum auf Falcon Plastik-Petri-Schalen pipettiert. Die Zellen wachsen in einschichtiger Lage auf dem Boden dieser Petri-Schalen.

II. Produktion von Adenoviren in Gewebezüchtung

a) Theoretische Vorbemerkung

Der Infektionsprozeß der Adenoviren verläuft in verschiedenen Phasen. Nach der Adsorption von vielen Virusteilchen an jede Zelle und deren Penetration in die Zelle, werden die Viren in Vakuolen aufgenommen. Das virale Mantel-Eiweiss wird teilweise entfernt (39) und der Virus-Kern in den Zellnucleus transportiert, wo die weitere Eiweißentfernung erfolgt. Dieser ganze Prozeß dauert ca. 2 Stunden und benötigt keine Neusynthese von Eiweiß (39-42). Schon vor der Synthese viraler DNA werden virale m-RNA Moleküle synthetisiert, die "frühe" m-RNA genannt werden (43-45) und von der Eltern-DNA transkribiert sein müssen. Gleichzeitig werden Proteine synthetisiert, die für die virale DNA-Synthese wichtig sind. Die virale DNA-Synthese beginnt für die verschiedenen Adenovirus-Typen zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt (46-48). M-RNA, die nach Beginn der viralen DNA Synthese entsteht, wird "späte" m-RNA genannt (41). Am Ende des Infektionszyklus wird Virus-Eiweiß gebildet, das mit der DNA zu intakten Virusteilchen zusammengefügt wird. In einer Zelle werden 5000 - 10 000

PFU (s.u.) produziert, was ungefähr 2oo ooo neuen Virusteilchen entspricht (49,5o).

b) Virusstämme:
Die nachfolgenden Stammviren wurden benutzt:
Ad 2 HEK_4,
Ad 7 GR M 76-3,
Ad 12 Mg 8-3 bis 5 Huie (NIH).

c) Methodik
Vor der Infektion wurden Suspensionskulturen von KB-Zellen 2o Min. bei Zimmer-Temperatur mit 37o x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in einem Zehntel des Ausgangsvolumens in M.E.M. mit 5 % Pferdeserum resuspendiert.(Endkonzentration: 2-5 x $1o^6$ Zellen pro ml.) Abhängig von der Art der Adenoviren wurde mit 1o,5o oder o,3 PFU (s.u.) von Ad 2, Ad 7 bzw. Ad 12 infiziert. Dies entspricht etwa 1oo Virusteilchen pro Zelle. Die Suspension wurde unter Rühren eine (Ad 2 und Ad 7) oder zwei (Ad 12) Stunden bei 37°C inkubiert, um die Adsorption der Viren an die Zellen zu ermöglichen. Die Suspension wurde dann mit M.E.M. mit 5 % Pferdeserum bis zu einer Zellkonzentration von 3 x $1o^5$ Zellen pro ml verdünnt und weiter bei 37°C inkubiert. Kurz vor der Lysis der Zellen, ein Zeitpunkt, bei welchem die intrazelluläre Virusformierung abgeschlossen ist, d.h. 27-3o Stunden nach Infektion für Ad 2 und Ad7 und 48 Stunden nach Infektion für Ad 12, wurden die infizierten Zellen durch Zentrifugation mit 37o x g bei 4°C gesammelt. Der Überstand wurde abgesaugt und der Niederschlag weiter behandelt (s.u.).

III. Bereitung von Stamm-Viren
Die KB-Zellen wurden infiziert und gesammelt, wie oben beschrieben. Das Zellsediment von ca. 6 Liter Zellen, ungefähr 3 x $1o^9$ Zellen entsprechend, wurde in 3o ml o,o1 M Tris-HCl Puffer pH 8,1 mit 3o % Glycerin resuspendiert, bei -2o°C eingefroren und wieder aufgetaut. Die Zellen

wurden dann durch Ultraschall vollends lysiert. Die so entstandene Suspension wurde als Stammviruslösung benutzt und bei -2o°C aufgehoben.

IV. Konzentrationsbestimmung der Adenoviren in einer Virus-Stammlösung mittels "Plaque -Titration".

Die "Plaque"-Titrationsmethode von BONIFAS und SCHLESINGER (51) und SCHLESINGER (52) mit der Abwandlung nach GREEN et al. (53) wurde angewandt. KB-Zellen aus Suspensionskulturen wurden bei 4°C mit 37o x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in EAGLE's M.E.M. mit 1o % Kalbsserum resuspendiert. Neun ml mit 2 x $1o^6$ Zellen wurden in Falcon Plastik Petrischalen (Ø 6o mm) auspipettiert und bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden war ein "Monolayer" gebildet. Das Medium wurde dann abgesaugt und die Zellagen mit 5 ml auf 37°C erwärmtem PBS gewaschen.

Von der Virus-Stamm-Lösung wurden zehnfache Verdünnungen mit vorgewärmter PBS mit o,2 % Rinderserum hergestellt. o,5 ml dieser Verdünnungen wurde auf den "Monolayer" auspipettiert und die Viren eine Stunde bei 37°C an den Zellen adsorbiert. Die Zellage mit dem adsorbierten Virus wurde dann mit 9 ml weißem Nähragar bedeckt und in einem CO_2-Inkubator bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 9o - 1oo rel.% inkubiert. Eine zweite Lage von 4 ml weißem Nähragar wurde nach 7 Tagen zugefügt und wieder 3 Tage später eine Lage von rotem Nähragar. Dort wo Viren eine Zelle infizieren, entstehen viele Tochterviren, die die Nachbarzellen infizieren. So entsteht ein durch den Agar bedingter umschriebener Herd, der als Aufhellung im roten Agar sichtbar wird. Diese Aufhellungen werden "Plaques" genannt. Ab dem 11. Tag nach der Infektion werden täglich die "Plaques" gezählt, bis ihre Zahl konstant bleibt. Die Zahl der "Plaques" korreliert mit der Anzahl der Viren im Ausgangsmaterial. Diese Korrelation wird in PFU (plaque forming units) ausgedrückt (s.o.).

V. Züchtung transformierter Zellen

Ratten-Embryo-Zellen, die durch Adenovirus Typ 2 transformiert waren (Zellinie 8617) wurden uns von Dr. A.E. FREEMAN zur Verfügung gestellt (68). Die Zellen sind kleiner als die KB-Zellen und multiplizieren sich schneller. Sie wurden in M.E.M. mit 5 % Pferdeserum in einer Konzentration von 5 - 1o x $1o^5$ Zellen pro ml gezüchtet.

VI. Markierung von Adenovirus DNA mit radioaktivem Thymidin

KB-Zellen wurden auf oben beschriebene Weise infiziert. Die Synthese von Ad 2 und Ad 7 DNA startet 7 Stunden nach Beginn der Infektion (46,47). Darum wurden infizierte Zellen 6 Stunden nach Beginn der Infektion mit o,o1 µCi/ml (2-^{14}C) Thymidin (43,7 mCi/m-mol) oder o,1 µCi/ml ^{3}H-Thymidin (11,9 Ci/m-mol) für 21 - 24 Stunden inkubiert. Das radioaktive Thymidin wurde von New England Nuclear Corp. oder Schwarz Bioresearch Inc. bezogen. In den ersten Experimenten wurde DNA mit ^{3}H-Thymidin markiert. Um die Möglichkeit von Artefakten durch DNA Brüche zu vermeiden, wurde in späteren Experimenten nur noch die intakte (2-^{14}C) Thymidin-markierte DNA benutzt. Die spezifische Aktivität betrug 1ooo - 5ooo cpm/µg.

VII. Markierung der RNA

Wie schon in der Einleitung erwähnt, unterscheidet man während der produktiven Infektion von KB-Zellen mit Adenoviren zwei Klassen viraler RNA-Moleküle: "Frühe" RNA, die vor, und "späte" RNA, die nach Beginn der viralen DNA Synthese gebildet wird. Weiterhin wird in durch Adenoviren transformierten Zellen eine virale RNA gebildet, die "transformierte" RNA genannt wird.

KB-Zellen, die mit Ad 2 infiziert waren, wurde 1-5 µCi/ml 5-^{3}H Uridin (2o-25 Ci/mmol, Schwarz, Bio-Research, Inc. oder New England Nuclear Corp.) von 2-4 Std., 2-6 Std.,

2-18 Std. oder 17-19 Std. nach Beginn der Infektion zugefügt. Markierte RNA von durch Ad 2 transformierten Ratten-Embryo-Zellen wurde durch achtstündige Markierung dieser Zellen mit 5 oder 1o µCi/ml 5-^{3}H Uridin gewonnen. Der Einbau der radioaktiven Substanz wurde gestoppt, indem man die Zellen mit einem gleichen Volumen zerhackten Eises mischte und anschließend 2o Min. mit 3oo x g bei 4°C abzentrifugierte. Das so gewonnene Zell-Sediment wurde mit eiskalter PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und bei -2o°C eingefroren.

BIOCHEMISCHE METHODEN

I. Isolierung und Reinigung von Adenoviren aus infizierten KB-Zellen

Zur Isolierung und Reinigung der Adenoviren wurde die Methode von GREEN und PINA (54) benutzt. Das eingefrorene Sediment von 1-3 l infizierter KB-Zellen (siehe Gewebezüchtung), das sich in 1o ml o,o1 M Tris Puffer pH 8,1 befand, wurde aufgetaut und anschließend wurden 4o ml vom gleichen Puffer hinzugefügt. Durch 6-1o-maliges Aufsaugen des Sedimentes in eine Pipette kommt es zur vollständigen Suspendierung des Sediments, das danach 5 Min. lang kräftig mit einem Raytheon-Oszillator sonifiziert wurde. Die aufgebrochenen Zellen wurden eine Minute bei 12.ooo rpm mit 4o ml Genetron (Trichloro-trifluoräthan) im Lourdes Multimix homogenisiert. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 71o x g wurde die wässrige Phase des Überstandes abpipettiert und erneut mit 3o ml Genetron extrahiert. Die zweite wässrige Phase wurde aufbewahrt. Die organischen Phasen beider Extraktionen wurden kombiniert und nochmals zentrifugiert. Die erneut entstehende wässrige Phase wurde der zweiten hinzugefügt und zusammen wurden sie auf 1o ml CsCl mit einer Dichte von 1,43 g/cm^{3} geschichtet. Dies erfolgte in 6o ml - Nitrocellulose Zen-

trifugationsröhrchen des Spinco SW 25.2 Rotors. Nach 6o Min. Zentrifugation bei 2o ooo rpm und 1o°C in einer präperativen Spinco-Ultrazentrifuge formte sich auf dem CsCl eine Virus-Bande, die gesammelt wurde. Die Dichte der gesammelten Virus-Lösung wurde mit kristallinem CsCl auf 1,34 g/cm^3 erhöht und auf ein Endvolumen von 5 ml gebracht. Diese Suspension wurde 24 Std. lang in einem Spinco SW 39 Rotor mit 3o ooo rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Zentrifugation führte zu einem Dichtegradienten des CsCl, in dem sich aufgrund der gewählten Ausgangsdichte der Suspension in der Mitte des Röhrchens die Virusbande formte. Durch Punktion des Röhrchens von unten wurde die Virusbande gesammelt, erneut auf 5 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,34 g/cm^3) gebracht und rezentrifugiert. Die so gewonnene Virusbande wurde schließlich bei 4°C in CsCl aufbewahrt.

II. Extraktion von DNA aus Adenoviren

a) Rekristallisierung des SDS

Zur Extraktion der viralen DNA ist Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) notwendig. Da diese Substanz aufgrund des Herstellungsverfahrens mit Na_2SO_4 verunreinigt ist, muß SDS rekristallisiert werden. 22o g SDS wurden in 5oo ml 8o %igem Äthanol unter ständigem Rühren kurz gekocht, durch vorgewärmte Buchner-Filter filtriert und das Filtrat anschließend gekühlt. Dabei entstehen farblose, amorphe Kristalle. Die kristalline Substanz wurde erneut auf einen Filter gebracht und mit kleinen Mengen kaltem Äthanol gewaschen. Anschließend erfolgte die Trocknung des SDS entweder bei 8o°C oder bei Zimmertemperatur unter Vakuum.

b) DNA-Extraktion und -Bestimmung

Ein gereinigtes Adenovirenpräparat wurde gegen 3 x 1oo Volumina o,5 M NaCl - o,o1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,8) - 1o^{-3}M EDTA bei 4°C dialysiert. Dann wurde die Konzentration des Tris-Puffers auf o,1 M erhöht und die Lösung eine

Stunde bei 37°C mit 250 µg kristallinem Papain/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis) inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 10 % rekristallisiertes SDS/ml hinzugefügt und nochmals 15. Min. bei 37°C inkubiert. Diese Lösung wurde darauf dreimal vorsichtig extrahiert: Mit einem gleichen Volumen Phenol, das bei 4°C mit 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,8 - 10^{-3}M EDTA abgesättigt war, wurde die Virus-Lösung versetzt und 10 Min. bei 4°C auf einer Scheibe mit 60 rpm rotiert. Die Phenol- und Wasserphase wurden durch 10-minütige Zentrifugation in einer Sorvall RC-2 Zentrifuge bei 27 000 x g getrennt. Die Wasserphase wurde dann erneut mit Phenol extrahiert, rezentrifugiert und nochmal extrahiert. Die kombinierten Wasserphasen wurden schließlich mit 300 - 500 Volumina 0,1 x SSC, 10^{-3}M EDTA pH 7,4-7,8 bei 4°C dialysiert. Die Konzentration der viralen DNA wurde mit Hilfe der Diphenylamin-Reaktion (55) bestimmt. Kälber-Thymus DNA diente als DNA-Standard, wobei dieser durch seinen Phosphatgehalt kalibriert war (56).

III. Denaturierung von Adenovirus-DNA durch Hitze oder Alkali und Komplexbildung von DNA mit Polyribonukleotiden

Die Hitzedenaturierung erfolgte im Wasserbad bei 100°C, indem virale DNA-Lösung in 0,1 x SSC, 10^{-3}M EDTA, pH 7,8 für 3 Min. erhitzt wurde. Anschließend wurde die Lösung rasch in Eiswasser gekühlt.

Die Alkalidenaturierung erfolgte bei Zimmertemperatur, indem der viralen DNA-Lösung 0,1 Volumen 1 NaOH (End-pH 12,7) zugefügt wurde. 10 Min. nach Einwirken der NaOH wurde die Lösung mit 0,1 Volumen 1 N HCl plus 0,1 Volumen 1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,2) neutralisiert.

Polyribonukleotide zur Komplexbildung mit denaturierter DNA wurden im Falle der Hitzedenaturierung vor der Erhitzung von DNA und im Falle der Alkalidenaturierung vor der Neutralisation (s.o.) hinzugefügt. Wenn zum Studium

der pH-Abhängigkeit der Komplexbildung niedrigere pH-Werte nötig waren, wurde o,o5 Volumen 1 N HCl plus o,1 Volumen o,2 M Zitrat-HCl-Puffer pH 6,o oder pH 5,o der alkalisch denaturierten DNA-Lösung hinzugefügt. Die Polyribonukleotide wurden von Miles Laboratories, Elknardt, Indiana; Schwarz Bioresearch Inc. Orangeburg, New York und General Biochemicals, Chagrin Falls, Ohio, bezogen.

IV. Alkalische Hydrolyse der Polyribonukleotide

Diese war zur Reduzierung des Molekulargewichtes der Polyribonukleotide notwendig. Zu diesem Zweck wurde die Polyribonukleotidlösung mit o,1 Volumen 1 N NaOH verschieden lang (s. Tab.3 und 7) bei Zimmertemperatur inkubiert, gekühlt und anschließend mit o,1 Volumen 1 M KH_2PO_4 oder o,1 M HCl plus o,1 Volumen o,1 M Tris-HCl Puffer pH 7,2 neutralisiert (57,58).

V. Analytische Band-Zentrifugation der Adenovirus DNA-Polyribonukleotid-Komplexe

Dazu wurde das Verfahren von VINOGRAD et.al. (59) benutzt. Beckman Typ I, 12 mm, 4^{o}, Band-Sedimentations-Zellen wurden mit o,6 ml 1 N NaCl-o,o1 M Tris HCl Puffer (pH 7,2) oder mit o,6 ml o,9 N NaCl-o,1 N NaOH (pH 12,8) gefüllt. 3o µl DNA wurden in das Probenloch pipettiert. Durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit fließt die DNA auf die oben genannten Salzlösungen. Während der Zentrifugation bei 4o.ooo rpm bei $2o^{o}C$ in der Spinco Modell E-Zentrifuge sedimentiert die DNA als ein Band durch die Salzlösung. Die Tatsache, daß DNA UV-Licht absorbiert, wurde ausgenutzt, um während der Zentrifugation alle 2 Min. UV-Bilder auf Kodak-Filmen zu machen. Auf diese Weise kann die Sedimentationsgeschwindigkeit der DNA verfolgt werden. Nach Entwickeln der Bilder in Kodak D11 Entwickler wurde die Schwärzung der Filme mit Hilfe eines Joyce-Loebl-Mikrodensitometers graphisch registriert.

Der Sedimentationskoeffizient S der DNA wurde mit nachfolgender Gleichung berechnet:

$$S = \frac{1}{\omega^2 x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

wobei: ω die Winkelgeschwindigkeit
x den Abstand des Bandes zum Rotationszentrum des Rotors und
t die Zeit

darstellen. Diese Gleichung kann auch in folgender Weise geschrieben werden:

$$S = \frac{2{,}303 \cdot 60^2}{(2\pi)^2 \cdot 60} \cdot \frac{1}{rpm^2} \cdot \frac{d \log_{10} x}{dt}$$

Alle S-Werte der DNA wurden auf $S_{20,w}$-Werte, das sind Werte, die zu erwarten sind, wenn die DNA in einer Lösung zentrifugiert würde, die die Dichte und Viskosität von Wasser bei 20°C hat, mit folgender Formel korrigiert:

$$S_{20,w} = S\left(\frac{\eta_{H_2O,t^\circ}}{\eta_{H_2O,20}}\right)\cdot\left(\frac{\eta_{Lösungsmittel}}{\eta_{H_2O}}\right)_{20\text{-}25^\circ C}\cdot\left(\frac{(1-\bar{v}\rho)_{20,w}}{(1-\bar{v}\rho)_{t\ Lösung}}\right)$$

wobei $\frac{\eta_{H_2O,t^\circ}}{\eta_{H_2O,20}}$ dem Verhältnis der Viskositäten von Wasser bei t und bei 20°C,

$\left(\frac{\eta_{Lösungsmittel}}{\eta_{H_2O}}\right)_{20\text{-}25^\circ C}$ dem Verhältnis der Viskositäten des Lösungsmittels und von Wasser bei 20-25°C,

$\bar{v}$	das partielle spezifische Volumen der Teilchen,
ρ_{20w}	die Dichte von Wasser bei 20°C, und
ρ_t Lösung	die Dichte der Lösung bei einer Temperatur von t°C entspricht.

Die letzten zwei Teile der oben beschriebenen Gleichung wurden zu einem einzigen Korrektionsfaktor zusammengefaßt, wobei diesem die von HEARST (61) und STUDIER (62) publizierten Werte für Viskosität, Dichte und partielles, spezifisches Volumen der DNA zugrundegelegt wurden. Die Molekulargewichte wurden aus den $S_{20,w}$-Werten nach folgender Beziehung berechnet:

$$S_{20,w} = 0{,}0528 \cdot M^{0{,}400} \quad \text{für}$$

DNA in alkalischer Lösung und

$$S_{20,w} = 0{,}0105 \cdot M^{0{,}549} \quad \text{für}$$

native DNA (62).

VI. Analytische Äquilibrierungs-Zentrifugation der viralen DNA-Polyribonukleotid-Komplexe im Cäsium-Chlorid-Dichte-Gradienten

Kristallines Cäsium-Chlorid wurde einer Lösung mit viralem DNA-Polyribonukleotid-Komplex zugefügt, um eine Dichte von 1,725 bis 1,775 g/cm^3 zu erreichen. Drei bis 5 µl (entsprechend 1 bis 3 µg) einer geeigneten Referenz-DNA wurde 0,6 ml des DNA-Polyribonukleotid-Komplex zugefügt. Dieses Lösungsgemisch wurde 20 - 24 Stunden bei 20°C und 44.000 rpm in einer 12 mm, 4° Kel F Zelle der Spinco Modell E Zentrifuge zentrifugiert. Die "Bouyant Densities" der Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA, sowie der DNA-Poly (U,G)-Komplexe wurde aus der graphischen Darstellung der UV-Bilder mit Hilfe der Formel $\rho = \rho_o + 0{,}0092\ (r^2 - r_o^2)$ (63)

berechnet. ρ_o und r_o bedeuten Dichte und Abstand zum Rotationszentrum der Referenz-DNA und ρ und r die gleichen Werte für die zu untersuchende DNA-Probe. Als Referenz-DNA dienten Clostridium perfringens DNA und Micrococcus lysodeikticus DNA der Firma Sigma Chemicals Co. St.Louis, Missouri und außerdem Sarcinea lutea DNA, die uns von Prof. Dr.Joseph Eigner, St.Louis,USA, überlassen wurde.

VII. Präparative Zentrifugation der DNA-Polyribonukleotid-Komplexe im Cäsium-Chlorid-Dichte-Gradienten

DNA wurde in Anwesenheit von Poly (U,G) oder Poly (I,G) (64) denaturiert, danach wurde CsCl hinzugefügt, um eine Dichte der Lösung herzustellen, die mit dem Mittelwert der Dichten der zwei zu erwartenden DNA-Polyribonukleotid-Banden übereinstimmte. Dieser Mittelwert wurde vorher durch analytische Zentrifugation gleichartiger DNA-Poly (U,G) oder DNA-Poly (I,G)-Präparationen bestimmt. Fünf bis sechs ml Lösung, die ungefähr 1oo µg DNA enthielten, wurden in einem silikonisierten Polyallomer-Röhrchen, das mit Paraffin-Öl bedeckt war, 24 Std. in einem Spinco-Titanium 5o-Rotor bei 15-2o°C mit 35.ooo rpm zentrifugiert und anschließend wurde die Geschwindigkeit 24 Std. auf 3o.ooo rpm reduziert. Die langsamere Rezentrifugation führte zu einer besseren Trennung der DNA-Banden.

Nach der Zentrifugation wurde das Röhrchen mittels eines beweglichen Tischchens vorsichtig nach oben bewegt, so, daß die an einem Stativ befestigte Nadel langsam von oben in den Gradienten eintauchte. Das Röhrchen wurde so lange nach oben bewegt, bis die Nadel den Boden des Röhrchens erreichte. Dann wurde der Gradient mit Hilfe einer Buchler-Schlauchpumpe mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min. abgepumpt. Der Gradient wurde durch eine 2 mm große Durchström-Küvette eines Gilford-Spektrophotometers gepumpt. Hier erfolgte die kontinuierliche Absorptionsschreibung

bei 26o mμ. Nach dem Durchfluß durch die Küvette wurden 5o-1oo μl-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, die die schwere (H) und leichte (L) Bande formten, wurden schließlich kombiniert und bei 4°C aufbewahrt. Die Bezeichnungen H und L beziehen sich auf die jeweiligen Banden mit höherer, bzw. niedrigerer Dichte.

VIII. Fixierung von DNA auf Filter zur Hybridisierung

Wir verwendeten dazu das Verfahren von GILLESPIE und SPIEGELMAN (65). Doppelsträngige in o,1 x SSC, $1o^{-3}$M EDTA gelöste DNA wurde in der oben beschriebenen Weise denaturiert. Die H- und L-Ketten der DNA befinden sich nach der Trennung in hochmolarer CsCl-Lösung. Die Lösungen mußten deshalb unter Vakuum gegen o,1 x SSC, $1o^{-3}$M EDTA bei 4°C über Nacht dialysiert und eingeengt werden.
SCHLEICHER und SCHÜLL B 6 Membranfilter mit einem Durchmesser von 25 mm wurden verwendet. Sie wurden ca. 2o min. in 2 x SSC geweicht und anschließend durch Durchsaugen von 2 x SSC gewaschen.
Die denaturierte DNA, bzw. die H- und L-Ketten der DNA wurden an die Filter fixiert, indem die Präparationen in 5 ml 2 x SSC verdünnt, filtriert wurden. Anschließend wurden die Filter durch Sog mit 5o ml 2 x SSC nachgespült, und mindestens 4 Std. an der Luft und 2 Std. bei 8o-82°C getrocknet. Mit Hilfe radioaktiv markierter DNA konnte gezeigt werden, daß 98-1oo % der DNA an die Filter fixiert war. Diese DNA-fixierten Filter wurden als Makro-Filter (ø 25 mm, s.o.) oder als Mikrofilter (ø 6,5 mm) verwendet. Letztere konnten durch Ausstanzen aus den Makrofiltern hergestellt werden.

IX. Extraktion der RNA aus infizierten KB-Zellen oder aus transformierten Ratten-Embryo-Zellen

Wir verwendeten eine eigene Modifikation der von SHERRER und DARNELL (66) und WARNER et.al. (67) beschriebenen Metho-

de. Das Sediment von Ad 2 infizierten KB-Zellen, die (5-^{3}H) Uridin markiert waren, wurde in 15 Volumen o,o5 M Acetat-Puffer, 1o^{-2}M EDTA, pH 5,1 resuspendiert. Diese Suspension wurde 1o min. lang bei Zimmertemperatur mit SDS in einer Endkonzentration von 1 % inkubiert und danach 3 Min. lang bei 6o°C unter Schütteln mit einem gleichen Volumen von obigem Puffer mit gesättigter Phenollösung extrahiert. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Abkühlung der Lösung in Eiswasser. Phenol- und wässrige Phase wurden durch Zentrifugation (3 min. 4°C, 2o.ooo x g) in einer Sorvall RC-2B Zentrifuge getrennt. Man erhielt dann ein Sediment, eine wässrige Phase und eine Phenol- sowie eine Zwischenphase. Die Phenolphase wurde verworfen. Das Sediment und die Zwischenphase wurden in einem halben Volumen des oben erwähnten Acetat-Puffers resuspendiert und anschließend mit dem gleichen Volumen Phenol extrahiert und rezentrifugiert. Die gewonnene wässrige Phase wurde mit der wässrigen Phase der ersten Extraktion kombiniert und noch zweimal mit Phenol extrahiert. Die RNA befindet sich schließlich in der kombinierten wässrigen Phase. Sie wird mit 3/1oo Volumen 5 M NaCl (Endkonzentration der NaCl ist o,15 M) und 2,5 Volumen 95 %igem Äthanol bei -2o°C für mindestens 4 Std. oder über Nacht gefällt. Der Niederschlag wurde bei 4°C und 27.ooo g 3o min. abzentrifugiert, mit o,o3 M Tris-Puffer, pH 7,2 - o,o1 M Mg Cl_2 resuspendiert und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Dann wurde die Suspension mit Worthington DNase (elektrophoretisch gereinigt und frei von RNase) in einer Endkonzentration von 5o µg/ml bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Nach Hinzufügen von SDS (Endkonzentration o,5 %) wurden die oben beschriebenen Phenolextraktionen, sowie die Äthanolfällung wiederholt. Manchmal mußte eine zweite DNase Inkubation mit den nachfolgenden Extraktions-Schritten angeschlossen werden, da noch DNA in der Suspension nachweisbar war.

Zum Schluß wurde RNA gegen 3oo Volumen o,1 x SSC, $1o^{-3}$M EDTA oder 2 x SSC dialysiert und schließlich bei -2o°C aufbewahrt. Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe der Orcinol-Methode bestimmt (68).

X. DNA-RNA-Hybridisierung

RNA hat die Eigenschaft RNase resistente DNA-RNA Hybride zu bilden. Das Verfahren von GILLESPIE und SPIEGELMAN (65), modifiziert von FUJINAGA und GREEN (12) für Adenoviren, diente zur Hybridisierung von DNA-Ketten mit virusspezifischer RNA infizierter und transformierter Zellen.
Zuerst wurde die RNA-Lösung auf eine Salzkonzentration von 2 x SSC - o,1 % SDS gebracht. Szintillationsgefäße wurden mit je einem Makrofilter (s.o.) oder 1o x 75 mm Glasröhrchen mit je einem Mikrofilter (s.o.) beschickt. Isolierte DNA-Ketten wurden vorher an die Filter fixiert (s.o.). Dann erfolgte das Zupipettieren von jeweils o,5 - 1,o ml RNA-Lösung im Falle der Benutzung von Makrofilter und o,15 ml der RNA-Lösung bei Verwendung von Mikrofiltern. Anschließend wurden die die Filter enthaltenden Gläschen 2o Std. bei 67°C im Wasserbad mit langsamer Bewegung inkubiert. Danach folgte das Waschen der Makrofilter in zwei Bechergläsern mit je 35o ml 2 x SSC und anschließender Saugfiltration mit je 5o ml 2 x SSC von beiden Seiten. Die Mikrofilter wurden fünfmal mit 1 ml 2 x SSC geschüttelt und jeweils die Waschlösung abgesaugt. Nach dem Waschen wurden die Makrofilter mit 5 ml und die Mikrofilter mit o,5 ml RNase (2o µg/ml in 2 x SSC) eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.Die RNase-Lösung war zur Zerstörung kontaminierender DNase 1o min. bei 9o°C vorinkubiert. Nach erfolgter RNase-Behandlung wurden die verschiedenen Waschvorgänge wiederholt und die Filter eine Stunde bei 8o°C getrocknet. Die auf den Filtern fixierte Radioaktivität wurde in einer wässerigen Szintillationsflüssigkeit an einem Beckmann-Messplatz gezählt.

XI. Elution hybridisierter RNA

Zur Verwendung bestimmter RNA für weitere Hybridisierungen war es notwendig, die DNA-RNA-Hybride zu trennen und die RNA vom Filter zu eluieren. Wenn RNA eluiert werden sollte, wurde auf die RNase-Behandlung mit den nachfolgenden Waschvorgängen verzichtet. Filter, deren Radioaktivität gemessen wurde, mußten zuerst in 2 x 1oo-ml Toluol im Becherglas gewaschen werden. Danach erfolgte die Trocknung der Filter für 3o min. bei Raumtemperatur. Dann wurden die Filter 1o min. bei Zimmertemperatur in 1 ml (für Makrofilter) bzw. o,5 ml (für Mikrofilter) 2 x SSC inkubiert, der Überstand abgesaugt und die Filter mit 1 bzw. o,5 ml o,1 x SSC gewaschen. Zur Elution der RNA wurden anschließend Makrofilter in o,5 - 1,o ml und Mikrofilter in o,2 - o,5 ml o,1 x SSC 1o min. lang bei 8o°C inkubiert. Bei diesem Schritt wurde die RNA eluiert, während die DNA am Filter fixiert blieb. Die RNA-enthaltende SSC-Lösung wurde abpipettiert, die Filter erneut in den oben beschriebenen Volumina von o,1 x SSC gewaschen und die Waschlösung der ersten Elutionslösung zugefügt.

ERGEBNISSE

I. Isolierung der DNA aus Adenoviren

Am Anfang wurden zwei Methoden zur Bereitung der Einzelketten der viralen DNA (H und L) aus gereinigtem Virus benutzt. Als Kriterien für die Brauchbarkeit der Methoden galten: Erstens die Möglichkeit intakte DNA-Ketten zu isolieren und zweitens deren Kapazität Polyribonukleotide zu binden (Tab.1).

TABELLE 1

Vergleich der Bindung von Poly (U,G) an DNA, die durch die Detergenz-Hitze- oder die Phenol-Alkali-Methode aus Ad 2 Virus isoliert wurde

Exp.	Behandlung des Virus	Poly (U,G)-Präparation (U:G Verhältnis)	Verhältnis DNA : Poly (U,G)	Dichte-Zunahme (mg/cm^3)		Dichte Unterschied (mg/cm^3)
I	Detergenz-Hitze	1,35 : 1	4 : 5	3o	43	13
	Phenol-Alkali	1,35 : 1	4 : 5	45	6o	15
II	Detergenz-Hitze	1,35 : 1	1 : 1	36	52	16
	Phenol-Alkali	1,35 : 1	1 : 1	34	47	13
III	Detergenz-Hitze	o,98 : 1	1 : 1	35	44	9
	Phenol-Alkali	o,98 : 1	1 : 1	42	5o	8

Detergenz-Hitze-Methode: Eine Menge Ad 2 Virus, die ca. 5 µg DNA entsprach, wurde 3 Min. bei 1oo°C mit 5 µg Poly (U,G) und o,3% Sarkosyl NL 97 in einem Volumen von 3o µl inkubiert und dann schnell in Eiswasser gekühlt.

Phenol-Alkali-Methode: Fünf µg Ad 2 DNA, die mittels Phenol Extraktion gewonnen wurden, wurden alkalisch denaturiert. Fünf µg Poly (U,G) wurde direkt vor der Neutralisierung hinzugefügt (s. MATERIAL und METHODEN).

Durch Hinzufügen von CsCl wurde die Dichte der Proben auf 1,775 $g/6m^3$ gebracht. Die Proben wurden dann mit 1 µg Sarcina lutea DNA als Referenz (ρ = 1,731) in einer analytischen Ultrazentrifuge bis zur Äquilibrierung zentrifugiert. Die Dichte-Zunahme stellt den Unterschied zwischen der Dichte des DNA-Poly (U,G) Komplexes und der denaturierter DNA (ρ = 1,73o g/cm^3) dar. Der Dichte-Unterschied ist die Differenz der Dichten der beiden Ketten DNA-Poly (U,G) Komplexe.

a) Detergens-Hitze-Methode

Diese Methode wurde zuerst durch HRADECNA und SZYBALSKI (64) angewandt, um DNA aus Bakteriophagen zu isolieren. Der Viruslösung wurde Sarkosyl NL 97 bis zu einer Endkonzentration von o,1 - o,3 % zugefügt und anschließend Hitzedenaturiert, wie unter MATERIAL und METHODEN beschrieben.

b) Phenol-Alkali-Methode

Virus DNA wurde mittels vorsichtiger Phenolextraktion isoliert und mit Alkali denaturiert (s. MATERIAL und METHODEN).

Mit beiden Verfahren konnte Virus DNA mit gleicher Bindungskapazität für Poly (U,G) isoliert werden: Tab.1 zeigt die vergleichbare Zunahme der Dichte der DNA's und das Auftreten von zwei DNA-Poly (U,G)-Banden im CsCl-Dichtegradienten. Sarkosyl NL 97 verursachte jedoch Probleme während des fraktionierten Sammelns der CsCl-Gradienten. Außerdem führte die Hitzedenaturierung der DNA zu Brüchen innerhalb der DNA-Ketten, wenn Poly (U,G) nach Isolierung der DNA-Poly (U,G)-Komplexe mittels Alkali entfernt wurde (s.u.). Wir verwendeten deshalb in allen weiteren Experimenten denaturierte Virus-DNA, die mit Hilfe der Phenol-Alkali-Methode isoliert war.

II. Bindung von Homopolymeren an denaturierte Adenovirus DNA

Die Fähigkeit von Poly (A), Poly (C), Poly (G) und Poly (U) sich an denaturierte Ad 2 DNA zu binden, wurde näher untersucht. Bei neutralem pH (7,2) wurden nur Poly (G) und Poly (U) in Mengen gebunden, die ausreichten, um die Dichte der denaturierten DNA zu erhöhen (Tab.2).

SHELDRICK und SZYBALSKI (69) vermuteten, daß die Bindung von Polyribonukleotidaggregaten an DNA notwendig sei, um eine signifikante Dichtezunahme zu erreichen. Poly (C) besteht bei neutralem pH aus Einzelketten, formt jedoch bei pH-Werten zwischen 3,o und 5,7 intermolekulare Helices (7o).

TABELLE 2

Bindung von Homopolymeren an denaturierte Ad 2 DNA

Homopolymer	pH	Verhältnis von DNA:Homopolymer	Dichte (g/cm^3)
kein	7,2		1,73o
	8,o		1,73o
	5,o		1,722
Poly (A)	7,2	1 : 1	1,73o
		1 : 5	1,73o
		1 : 1o	1,73o
	5,o	1 : 1	1,725
		1 : 5	1,726
		1 : 1o	1,725
Poly (C)	7,2	1 : 1	1,73o
		1 : 5	1,731
		1 : 1o	1,731
	5,o	1 : 1	1,744
		1 : 5	1,751
		1 : 1o	1,754
Poly (G)	7,2	5 : 1	1,75o
		1 : 1	1,816
Poly (U)	7,2	1 : 1	1,746
		1 : 5	1,744
		1 : 1o	1,742
	5,o	1 : 1	1,726
		1 : 5	1,727
		1 : 1o	1,726
	8,o	1 : 1	1,735
		1 : 5	1,736
		1 : 1o	1,737

AD 2 DNA (2,4 µg) wurde alkalisch denaturiert, der Homopolymer in oben aufgeführtem Verhältnis hinzugefügt und der gewünschte pH eingestellt, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben. Die analytische Zentrifugation im CsCl-Dichte Gradienten mit 3 µg Clostridium perfringens DNA als Referenz (ρ = 1,691) wurde ebenfalls wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben ausgeführt.

Auch Poly (A) formt bei niedrigen pH-Werten solche intermolekularen Helices (71). Deshalb wurden Gemische von denaturierter Ad 2 DNA mit Poly (A) oder Poly (C) bei einem pH von 5,o und 6,o zentrifugiert. Bei pH 5,o nahm die Dichte der denaturierten Ad 2 DNA durch Poly (C) wesentlich, durch Poly (A) nur geringgradig zu (denaturierte Ad 2 DNA besitzt bei pH 5,o eine Dichte von 1,722). Tab.2 zeigt die Ergebnisse. Die Dichtezunahme der denaturierten

Ad 2 DNA durch Poly (C) war proportional der Homopolymer-Konzentration. Bei pH 7,2 nahm die Dichte der DNA durch Poly (U)-Bindung durchschnittlich um 14 mg/cm^3 zu. Zunehmende Verhältnisse von DNA zu Poly (U) wie 1:1, 1:5 und 1:1o ergaben keine größere Dichtezunahmen. Bei pH 8,o betrug die Dichtezunahme durch Poly (U) maximal 7 mg/cm^3, wahrscheinlich aufgrund langsamer Hydrolyse des Ribopolymers bei diesem erhöhten pH. Obgleich zwischen denaturierter Ad 2 DNA und Poly (A), Poly (C) und Poly (U) Komplexe gebildet wurden, kam es unter den untersuchten Bedingungen nicht zur Trennung der DNA-Ketten. Poly (G) verursachte eine Dichtezunahme der denaturierten Ad 2 DNA proportional der Poly (G) Konzentration. Gleichzeitig zeigte sich eine starke Verbreitung der DNA-Poly (G) Peaks. Vermutlich handelt es sich dabei um zunehmende Aggregation von Poly (G) Molekülen mit Entstehen von Interkettenkomplexen. Poly (G) wurde daher 1o min. bis 24 Std. bei Zimmertemperatur mit Alkali inkubiert, um seine Kettenlänge zu verkürzen (57) und damit die Komplexbildung mit denaturierter DNA bei reduzierter Interkettenbildung zu verbessern. Nur vierstündige Alkalibehandlung der Poly (G) führte zu einer geringfügigen Trennung der Ad 2 DNA Ketten. Diese reichte jedoch zur präparativen Kettentrennung nicht aus (Tab.3).

TABELLE 3

Effekt alkalischer Behandlung von Poly (G) auf seine Bindungskapazität an Ad 2 DNA

Dauer der alkalischen Behandlung	Verhältnis von DNA:Poly(G)	Dichte-Zunahme (mg/cm^3)	Dichte Unterschied (mg/cm^3)
o Min.	1 : 1	89	o
1o Min.	1 : 1	5o	o
1 Std.	1 : 1	2o	o
2 Std.	1 : 1	2o	o
3 1/2 Std.	1 : 1	2o	o
4 Std.	1 : 1	1o 14	4
	1 : 5	12 15	3
	1 : 1o	11 16	5
	1 : 2o	12 15	3
5 Std.	1 : 1	2o	o
8 Std.	1 : 1	6	o
16 Std.	1 : 1	4	o
24 3/4 Std.	1 : 1	2	o

Poly (G) wurde für oben aufgeführte Dauer bei Zimmertemperatur in o,1 N NaOH inkubiert und darauf mit o,1 Volumen 1 N HCl und 1 M Tris-HCl Puffer (pH 7,2) neutralisiert. Ad 2 DNA wurde alkalisch denaturiert und Poly (G) wurde direkt vor der Neutralisierung der DNA Lösung hinzugefügt. Die Proben wurden dann in einer analytischen Ultrazentrifuge im CsCl Dichte-Gradienten mit Micrococcus lysodeikticus DNA als Referenz DNA (ρ = 1,731) zentrifugiert. Die Dichte-Zunahme der DNA Ketten ist dieselbe, wenn nur ein Wert, unterschiedlich, wenn zwei Werte aufgeführt sind. Die Dichte denaturierter AD 2 DNA ist 1,73o g/cm^3.

III. Bindung von G-enthaltenden Copolymeren an denaturierte Ad 2, 7 und 12 DNA

Ziel dieser Untersuchung war, ob der Dichteunterschied zwischen den beiden DNA-Ketten (H und L) durch eine Komplexbildung mit G-haltigen Copolymeren anstelle des Homopolymers G vergrößert werden konnte.

a) Eigenschaften von Poly (U,G) und Poly (I,G) Präparationen

Die Charakteristika der von uns untersuchten Poly (U,G) und Poly (I,G) Präparationen sind in Tab.4 zusammengefaßt. Die $S_{20,w}$-Werte sind Annäherungswerte, da die sedimentierenden Banden sehr breit waren, was auf eine Heterogenität der Poly (U,G) und Poly (I,G) Präparationen hinweist. Auch in der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zeigte sich eine breite Verteilung der Poly (U,G) Molekülgrößen.

TABELLE 4

Eigenschaften der Poly (I,G) und Poly (U,G) Präparate

Typ	KOPOLYMER Verhältnis von I: G oder U:G +)	Molekulargewicht +)	$S_{20,W}$	Maximaler Dichte-Unterschied (mg/cm^3)++)
(I,G)	1,o : 1	≥1oo.ooo	7,5	o
(U,G)	o,31 : 1	158.ooo	1,6-5,o	7
(U,G)	o,98 : 1	≥1oo.ooo	4,3	8
(U,G)	1,1 : 1	≥1oo.ooo	5,1	7
(U,G)	1,12 : 1		4,3	11
(U,G)	1,2 : 1		4,4	9
(U,G)	1,35 : 1	≥1oo.ooo	5,7	15
(U,G)	3,3 : 1	17o.ooo	2,9	17

+) Die I:G oder U:G - Verhältnisse wurden von den Firmen angegeben. Band-Zentrifugation fand in 1 M NaCl-o,o1 M Tris Puffer (pH 7,2) statt. Sowohl Band-Zentrifugation als auch Dichte-Gradienten Zentrifugation wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge ausgeführt (siehe MATERIAL und METHODEN).

++) Die maximalen Dichte-Unterschiede der DNA-Polyribonucleotid-Komplexe beziehen sich auf Resultate und Sättigungsmengen von Poly (I,G) oder Poly (U,G).

b) der Einfluß des U:G Verhältnisses in der Poly (U,G) Präparation und des DNA:Poly (U,G) Verhältnisses auf die Dichtezunahme und die Trennung der Ad DNA-Poly (U,G) Banden

Denaturierte Ad 2, 7 und 12 DNA's wurden mit verschiedenen Poly (U,G) Präparationen inkubiert und der Grad der Komplex-Bildung und Kettentrennung durch analytische Dichte-Gradienten-Zentrifugation bestimmt. In allen Fällen verursachte die Bindung des Ribopolymers (U,G) an Ad 2, 7 und 12 DNA eine starke Zunahme der Dichte im Vergleich zu der Dichte denaturierter DNA (5o-8o mg/cm^3) und eine zweigipfelige Verteilung der Ad DNA, die eine Trennung der DNA-Ketten vermuten ließ. Wie später gezeigt wird, enthalten diese zwei Gipfel die getrennten und intakten komplementären Ketten der Ad DNA. Fig.1 zeigt die Absorptionsspektren denaturierter Ad 2, 7 und 12 DNA-Poly (U,G) Komplexe nach analytischer Dichtegradienten-Zentrifugation. Die komplementären Ketten der Ad 2, 7 und 12 DNA Moleküle sind deutlich voneinander getrennt.

Eine detaillierte Analyse des Einflusses des viralen DNA:Poly (U,G) Verhältnisses und die relative Konzentration von U zu G im Copolymer auf die Dichtezunahme der DNA und dem Dichteunterschied der zwei DNA-Bänder ist in Tab.5 zusammengefaßt.

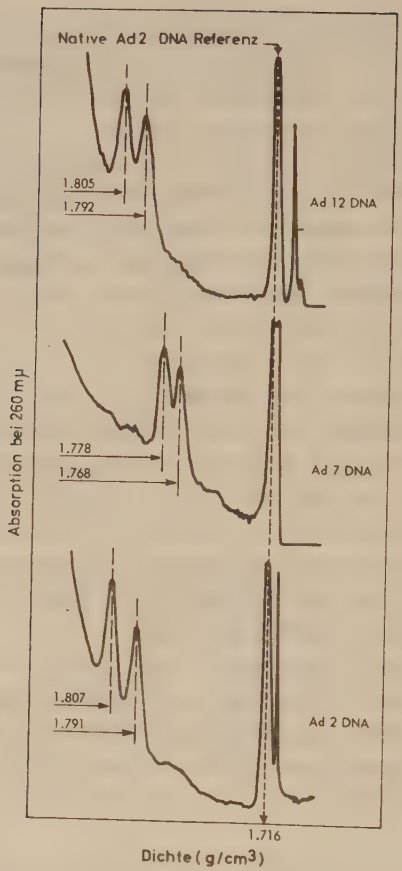

Fig.1. Trennung der Adenovirus DNA-Ketten in Form von DNA-Poly(U,G)-Komplexen: Fünf µg Ad 2,7 und 12 DNA wurden in Anwesenheit von 5 µg Poly (U,G) (U:G = 1,35:1) Hitze-denaturiert. Die Dichte der Lösung wurde mit CsCl auf 1,77o gebracht und 1,1 µg native Ad 2 DNA als Referenz DNA (ρ = 1,716) hinzugefügt. Die Proben wurden 24 Std. bei 2o°C mit 44.ooo rpm in einer analytischen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die grafische Registrierung der U.V. Photographien erfolgte mit einem Joyce-Loebl Mikrodensitometer.

TABELLE 5

Effekt unterschiedlicher Poly (U,G)-Präparate auf die Dichte-Zunahme denaturierter Ad DNA's und den Dichte-Unterschied zwischen komplementären Ketten

Kopolymer Verhältnis U:G	Herkunft der DNA	Verhältnis von DNA:Poly (U,G)	Dichte-Zunahme (mg/cm^3)	Dichte-Unterschied (mg/cm^2)
o,98 : 1	Ad 12	5 : 1	16	o
		1 : 1	54	o
		1 : 4	46 5o	4
		1 : 1o	54 63	9
	Ad 7	5 : 1	21	o
		1 : 1	43	o
		1 : 5	54	o
		1 : 1o	56 59	3
	Ad 2	5 : 1	16 19	3
		1 : 1	32 4o	8
		1 : 5	43 53	1o
		1 : 1o	47 55	8
1,12 : 1	Ad 12	5 : 1	14	o
		1 : 1	37 41	4
		1 : 4	48 55	7
		1 : 1o	84 89	5
	Ad 7	5 : 1	34	o
		1 : 1	36 39	3
		1 : 5	49 55	6
		1 : 1o	52 57	5
	Ad 2	5 : 1	21	o
		1 : 1	43 54	11
		1 : 5	52 62	1o
		1 : 1o	53 63	1o
1,2 : 1	Ad 12	5 : 1	17	o
		1 : 1	38 43	5
		1 : 5	5o 57	7
		1 : 1o	68 75	7
	Ad 7	5 : 1	14	o
		1 : 1	33 35	2
		1 : 5	47 51	4
		1 : 1o	52 56	4
	Ad 2	3 : 1	29 37	8
		1 : 1	38 47	9
		1 : 5	53 62	9
		1 : 1o	53 63	1o
1,35 : 1	Ad 12	5 : 1	27 39	12
		1 : 1	47 61	14
		1 : 5	68 81	13
		1 : 1o	7o 85	15
	Ad 7	5 : 1	11 16	5
		1 : 1	5o 6o	1o
		1 : 5	6o 69	9
		1 : 1o	66 76	1o
	Ad 2	5 : 1	15 24	9
		1 : 1	39 54	15
		1 : 5	61 77	16
		1 : 1o	67 83	16

TABELLE 5 (Fortsetzung)

Kopolymer Verhältnis U:G	Herkunft der DNA	Verhältnis von DNA:Poly (U,G)	Dichte-Zunahme (mg/cm^3)	Dichte-unterschied (mg/cm^3)
3,3 : 1	Ad 12	5 : 1	23 32	9
		1 : 1	44 57	13
		1 : 5	56 71	15
		1 : 1o	61 76	15
	Ad 7	5 : 1	1o 17	7
		1 : 1	34 45	11
		1 : 5	52 64	12
		1 : 1o	53 65	12
	Ad 2	5 : 1	11 18	7
		1 : 1	31 44	13
		1 : 5	48 65	17
		1 : 1o	52 69	17

Die in der Tabelle aufgeführten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte von zwei oder mehr Experimenten. Die Ergebnisse mit unterschiedlichen DNA Präparationen waren gut reproduzierbar.

Adeno-DNA wurde in Anwesenheit verschiedener Poly (U,G) Präparate und bei unterschiedlichem Verhältnis von DNA zu Poly (U,G) durch Hitze denaturiert. Die Proben wurden mit CsCl auf eine Dichte von ca. 1,77o gebracht und bis zum Gleichgewicht zentrifugiert, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben. Die Dichten von denaturierter Ad 12, 7 und 2 DNA betrugen 1,724; 1,729; bzw. 1,73o g/cm^3.

Der Effekt des U:G Verhältnisses auf Dichtezunahme und Dichteunterschied der DNA-Kette-Poly (U,G) Komplexe ist in Fig.2a und 2b dargestellt. Sowohl Dichtezunahme als auch Dichteunterschied nehmen mit zunehmendem U:G Verhältnis bis zu einem Verhältnis von 1,35:1 zu. Die leichte Abnahme der maximalen Dichte bei U:G = 1,2:1 kann durch einen geringen Fehler in der Angabe des U:G Verhältnisses dieser käuflichen Präparate bedingt sein. Es ist deutlich, daß Poly (U,G) eine bessere Kettentrennung als Poly (G) hervorruft, obwohl das Homopolymer (U) selbst keine Trennung bewirkt (Tab.2).

Ad 2, 7 und 12 DNA verhalten sich in ihrer Bindung zu Poly (U,G) Präparationen unterschiedlich (Tab.5). Ein Verhältnis von DNA:Poly (U,G) wie 1:1 ergab maximale Dich-

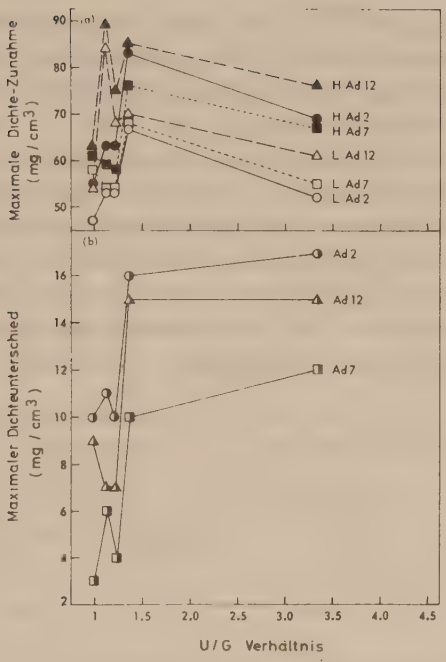

Fig.2. Auswirkung des U : G Verhaltnisses auf die Dichte-Zunahme und den Dichte-Unterschied der Adenovirus DNA-Ketten: Ad 2,7 und 12 DNA's wurden in Anwesenheit von Poly (U,G) Präparationen mit unterschiedlichem U/G Quotienten Hitze-denaturiert und 2o Std. bei 2o°C mit 44.ooo rpm im CsCl Dichte-Gradienten in einer analytischen Ultrazentrifuge zentrifugiert. Sarcina lutea DNA (ρ= 1,731) oder Micrococcus lysodeikticus DNA (ρ= 1,731) wurden als Referenzen verwendet. Die Dichte-Zunahme, bzw. der Dichte-Unterschied zwischen den zwei DNA-Poly (U,G) Komplexen wurde gegen das U : G Verhältnis der Ribopolymeren aufgetragen (siehe Tabelle 5 für Einzelheiten).

teunterschiede zwischen den komplementären Ketten von Ad 2, 7 und 12 DNA mit Poly (U,G) Präparationen, die ein größeres Verhältnis von U:G (1,35:1 und 3,3:1) hatten. Das gleiche Verhältnis von DNA:Poly (U,G) von 1:1 war ebenfalls günstig für die Trennung von Ad 2 DNA Ketten mit Poly (U,G),

die ein niedriges U:G Verhältnis besaß. Niedrigere Verhältnisse von DNA:Poly (U,G) waren jedoch für die Trennung von Ad 7 und 12 DNA Ketten mit den Poly (U,G) Präparationen notwendig (Tab.5).
Ad 12 DNA Ketten binden alle Poly (U,G) Präparationen in etwas größerer Menge als Ad 2 und 7 DNA Ketten. Dies kommt in den Dichtezunahmen zum Ausdruck (Fig.2a). Mit allen untersuchten Poly (U,G) Präparationen wurde die beste Trennung der DNA-Ketten mit Ad 2 DNA erreicht. Der Dichteunterschied der Ad 12 DNA Ketten war etwas geringer und der von Ad 7 DNA Ketten am geringsten (Fig.2b).

Verschiedene Versuche wurden unternommen, um den Dichteunterschied zwischen den DNA-Ketten durch eine Änderung der Sekundär-Struktur von Poly (U,G) zu erhöhen. Dazu wurde z.B. Ad 2 DNA in Anwesenheit von Poly (U,G) plus einem Homoribopolynukleotid (Poly (U), Poly (A) oder Poly (C)) denaturiert. Wie in Tab.6 gezeigt wird, führte die Zugabe eines Homopolymers nicht zu der gewünschten besseren Trennung der DNA-Ketten. Größere Mengen von Poly (C) und Poly (A), jedoch nicht von Poly (U), verminderten vielmehr die Kettentrennung.

TABELLE 6

Einfluß von Homopolymeren auf die Trennung der Ad 2 DNA Ketten in Form von DNA-Poly (U,G) Komplexen

Homopolymer	Verhältnis von Homopolymer :Poly (U,G)	Dichte-Zunahme (mg/cm^3)	Dichte Unterschied (mg/cm^3)
kein		49 59	1o
Poly (U)	1 : 1	54 65	11
	2 : 5	52 63	11
	1 : 5	53 63	1o
	1 : 1o	5o 6o	1o
Poly (A)	1 : 1	7o	o
	2 : 5	7o	o
	1 : 5	43 54 67	11 13 +)
	1 : 1o	45 54	9
Poly (C)	1 : 1	1o	o
	2 : 5	71	o
	1 : 5	52 64	12
	1 : 1o	53 63	1o

Fünf µg Ad 2 DNA wurden in Anwesenheit von 5 µg Poly (U,G) (U:G = o,83:1,o) und unterschiedlichen Mengen des Homopolymers (siehe oben aufgeführte Verhältnisse) durch Hitze denaturiert. Analytische Ultrazentrifugation mit Sarcina lutea DNA als Referenz DNA (ρ = 1,731) wurde, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben, ausgeführt. Die Dichte denaturierter Ad 2 DNA ist 1,73o.

+) Eine deutliche Trennung wurde mit dieser Präparation nicht erreicht und die Dichte-Unterschiede beziehen sich deshalb auf DNA-Schultern.

In einer zweiten Versuchsserie wurde Poly (U,G) mit Alkali behandelt, um Poly (U,G) zu verkleinern und möglicherweise seine Sekundärstruktur zu verändern (57), um damit bessere Kettentrennung zu erzielen. Eine Poly (U,G) Präparation (U:G = 1,1:1), die zu einem geringen Dichteunterschied zwischen Ad 2 DNA Ketten führte, erhöhte tatsächlich die Trennung der Ad 2 DNA Ketten nach einer 1o-6o minütigen Alkalivorbehandlung (Tab.7).

TABELLE 7

Einfluß von Alkali-Behandlung von Poly (U,G) auf seine Bindungsfähigkeit an Adenoviren DNA Ketten

Exp.	Dauer der alkalischen Behandlung (Min.)	Dichte-Zunahme (mg/cm^3)		Dichte-Unterschied (mg/cm^3)	Heterogenität L	H
I	o	32	39	7	o,o69	o,o68
II	5	43		o	o,228	
	1o	51	6o	9	o,195	o,222
	3o	5o	61	11	o,116	o,132
III	5	23		o	o,524	
	1o	46	52	6	o,318	o,551
	3o	36	46	1o	o,237	o,255
	6o	33	42	9	o,226	o,248

Poly (U,G) (U:G = 1,1:1) wurde bei Zimmertemperatur für die in der Tabelle angegebenen Zeiten in o,1 N NaOH inkubiert und die Lösung anschließend mit o,1 Volumen 1 N HCl und 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,2) neutralisiert. Hitze-Denaturierung der Ad 2 DNA in Anwesenheit von alkalisch behandelter Poly (U,G) und Analyse der geformten Komplexe wurde,wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben, ausgeführt. Die Heterogenität der L- und H-Ketten wurde von der grafischen Registrierung der UV. Photographien berechnet, indem die Gipfelbreite bei halber Gipfelhöhe durch die Gipfelhöhe dividiert wurde. Die Variation der Heterogenität zwischen verschiedenen Experimenten wurde durch unterschiedliche Film-Dichten verursacht.

Alkalivorbehandlung reduzierte außerdem die Heterogenität der DNA-Poly (U,G) Komplexe. Dies konnte aus der Bestimmung des Verhältnisses der Peakbreite in halber Peakhöhe

zur Gesamtpeakhöhe an der graphischen Darstellung von UV-Photographien gefolgert werden (58 und Tab.7). Poly (U,G) (U:G = 3,3:1), das selbst gute Kettentrennungen verursachte,war nach der Alkalibehandlung weniger wirksam. Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen somit, daß die Größe und Konfiguration von Poly (U,G) und das U:G Verhältnis der Moleküle für die Trennung von Adeno-DNA Ketten von entscheidender Bedeutung sind.

IV. Präparative Trennung der komplementären Ad 2 und 7 DNA Ketten

Ein Dichteunterschied von 1o bis 17 mg/cm^3 zwischen den beiden viralen DNA-Ketten-Poly (U,G) Komplexen macht eine präparative Trennung der Adeno-DNA Ketten möglich. Diese präparative Trennung erfolgte in vier Stufen:

a) Denaturierte DNA wurde mit einem geeigneten Polyribonukleotid inkubiert.
b) Das DNA-Polyribonukleotidgemisch wurde bis zur Gleichgewichtseinstellung in einem CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert.
c) Die Fraktionen des CsCl-Gradienten, die jeweils die Peaks enthielten, wurden gepoolt, und man erhielt so L- und H-DNA Ketten-Präparationen.
d) Die an die L- und H-Ketten gebundenen Polyribonukleotide wurden mit Alkali entfernt.

Präparative Trennung von Ad 2 DNA Ketten erfolgte mit fünf Poly (U,G) Präparationen, die ein U:G-Verhältnis von 3,3:1; 1,35:1; o,63:1; 1,12:1 und 1,2:1 besaßen.

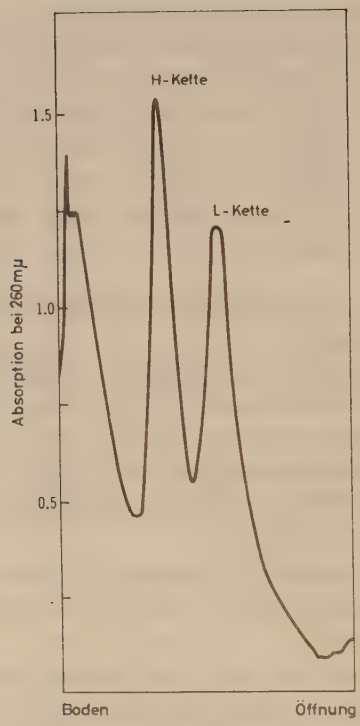

Fig.3. Präparative Trennung der Ad 2 DNA Ketten: Ad 2 DNA wurde alkalisch denaturiert und Poly (U,G)(U:G = 1,35:1) hinzugefügt. Das DNA : Poly (U,G) Verhältnis betrug 1:1. Die Dichte wurde mit CsCl auf 1,79o und das Volumen auf 6 ml. gebracht. Die Zentrifugation erfolgte 24 Std. mit 35.ooo rpm und nochmal 24 Std. mit 3o.ooo rpm in einem Titanium 5o Winkel Rotor der Spinco L 2 präparativen Zentrifuge. Fraktionen wurden gesammelt und die optische Dichte registriert, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben. (Die Absorption in Bodennähe wird durch freies Poly (U,G) verursacht.)

In Fig.3 ist die Trennung der Ad 2 DNA Ketten mit einer Präparation (U:G = 1,35:1) gezeigt. Ad 7 DNA Ketten konnten mit Poly (I,G) (I:G = 1,1:1) ebenfalls getrennt werden (Fig.4). Andere Polyribonukleotide wurden zur Trennung von Ad 7 DNA Ketten nicht getestet.

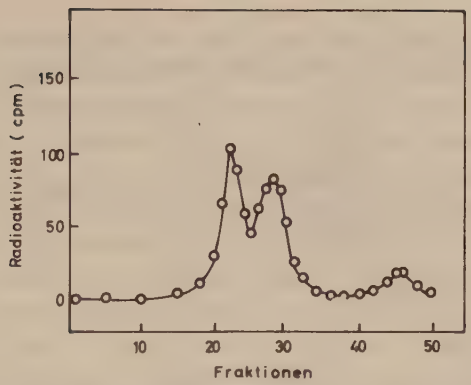

Fig.4. Präparative Trennung der Ad 7 DNA Ketten: Ad 7 DNA wurde in Anwesenheit von Poly (I,G) (I:G = 1:1; Poly (I,G) wurde eine Std. mit o,1 N NaOH vorbehandelt) Hitze-denaturiert. Die Dichte wurde auf 1,7o5 und das Volumen auf 1,5 ml gebracht. Diese Lösung wurde dann auf einen vorgeformten Gradienten geschichtet, der aus je einem ml CsCl Lösung der Dichten von 1,738; 1,754 und 1,77o bestand. Die Gradienten wurden dann 24 Std. mit 35.ooo rpm und nochmal 24 Std. mit 3o.ooo rpm bei 15°C in einem Titanium 5o Rotor zentrifugiert. Neunzig /ul Fraktionen wurden nach Perforation des Röhrchenbodens gesammelt und davon 5/ul Proben in wässeriger Scintillationsflüssigkeit gezählt.

Die durch präparative Zentrifugation erhaltenen Ad 2 DNA-Poly (U,G) Banden wurden anschließend auf Intaktheit der Ketten und auf Kontamination mit Schwestern-Ketten untersucht. Ein Teil der Probe, die zur präparativen Kettentrennung benutzt werden sollte, wurde einer analytischen Zentrifugation unterworfen (Fig.5a). Die H-Kette, die durch präparative Zentrifugation isoliert wurde, ist sehr rein, denn sie formt bei der analytischen Zentrifugation nur eine scharfe Bande (Fig.5c). Die L-Kette formt einen Hauptpeak bei der zu erwartenden Dichte und außerdem kleine Nebenpeaks, die auf Kontamination hinweisen (Fig.5b). Die Kontaminanten bestehen wahrscheinlich aus zweikettiger und zerbrochener DNA, die mit Poly (U,G) Komplexe geformt hatten. Durch Rezentrifugation konnten beide Kontaminanten entfernt werden.

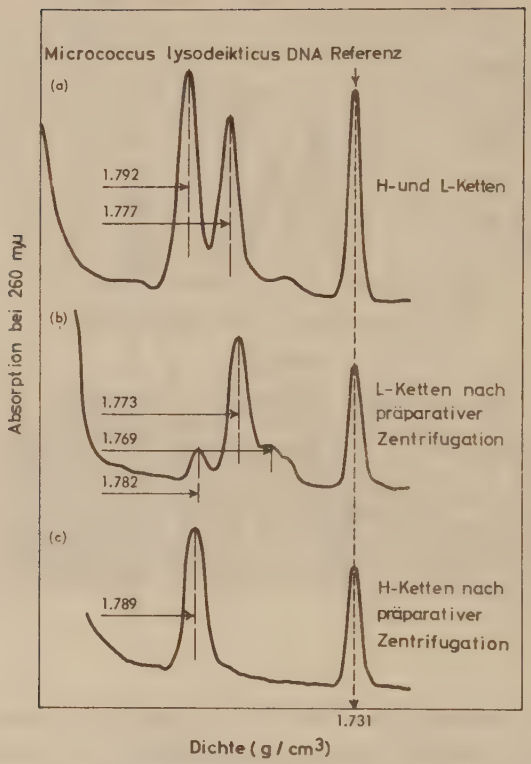

Fig.5. Analytische Dichte-Gradienten Zentrifugation der getrennten Banden der Ad 2 DNA-Poly(U,G)-Komplexe: Proben der Lösung vor präparativer CsCl Gradienten Zentrifugation in Fig.3 (a), der L-Gipfel Fraktionen (b) und der H-Gipfel Fraktionen (c) nach präparativer Zentrifugation wurden mit CsCl auf eine Dichte von 1,77o bis 1,78o und einem Volumen von o,6 ml gebracht. Die Proben wurden dann in einer analytischen Zentrifuge 2o Std. bei 2o°C mit 44.ooo rpm zentrifugiert, wobei Sarcina lutea DNA als Referenz DNA (ρ= 1,731) diente. Die Registrierung der U.V. Photographien erfolgte mit einem Joyce-Loebl Mikrodensitometer.

Die mit Hilfe der präparativen Zentrifugation isolierten L- und H-Banden wurden entweder durch Hitzedenaturierung in Gegenwart eines Überschusses von Poly (C) oder durch

Alkalibehandlung von der komplexgebundenen Poly (U,G) befreit. HRADECNA und SZYBALSKI (64) haben beschrieben, daß Poly (C) eine hohe Affinität zu Poly (U,G) besitzt und deswegen die gesamte Poly (U,G), die während der Hitzedenaturierung des DNA-Poly (U,G) Komplexes frei wird, bindet, wenn Poly (C) dabei im Überschuß vorhanden ist. Alkalibehandlung hingegen (o,1 Vol. 1 N NaOH, 1 Std. bei 37°C) führt zur Denaturierung des DNA-Poly (U,G) Komplexes und hydrolisiert Poly (U,G) so, daß es mit DNA keine Komplexe mehr bilden kann. Die Effektivität dieser beiden Verfahren zur Abtrennung von Poly (U,G) wurde mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation untersucht. Als ausreichende Entfernung von Poly (U,G) galt eine Erniedrigung der Dichte des DNA-Poly (U,G) Komplexes bis auf die Dichte denaturierter Ad 2 DNA Einzelketten (ρ=1,73o). In unseren Versuchen führte die Behandlung denaturierter DNA-Poly (U,G) mit Poly (C) nicht zu einer ausreichenden Entfernung von Poly (U,G). Nur in 3 von 14 Experimenten erhielten wir reine DNA Ketten der geforderten Dichte (ρ=1,73o bis 1,734), obwohl DNA-Poly (U,G) : Poly (C) Verhältnisse von 1:1 bis 1:5o verwendet wurden. Im Gegensatz dazu konnten mittels Alkalibehandlung L- und H-Ketten der Dichten von 1,73o bis 1,733 isoliert werden. Die Reinheit der L- und H-Kettenpräparationen nach Entfernung von Poly (U,G) wurde durch "self-annealing" und nachfolgende analytische Zentrifugation überprüft (Fig.6 a-f). Die "annealing"-Bedingungen (5-6 M CsCl, 4 Std., 65°C) führten zu guter Duplexbildung: Selbst mit denaturierter Ad 2 DNA in einer Konzentration von 5 µg/ml gelang ein vollständiges "annealing". "Self-annealing" von DNA-Ketten Präparationen wurde jedoch immer bei höheren DNA Konzentrationen durchgeführt. Die H-Kette formte sowohl vor (Fig.6a) als auch nach "self-annealing" (Fig.6b) einen scharfen Peak mit einer Dichte von 1,729-1,73o. Dies beweist den hohen Reinheitsgrad der H-Kette. Die L-Kette formte einen Peak

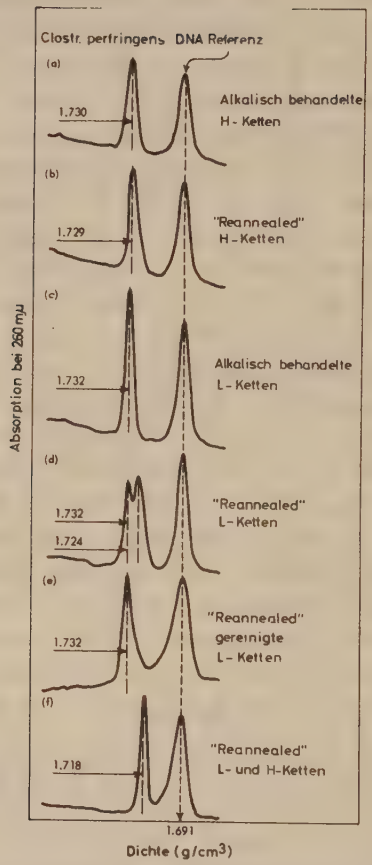

Fig.6. Analytische Dichte-Gradienten Zentrifugation der Ad 2 H und L DNA Ketten nach alkalischer Behandlung und nach alkalischer Behandlung und "Annealing": H und L Gipfel Fraktionen der präparativen CsCl Gradienten, wie in Fig.3 dargestellt, wurden eine Std. bei 37°C in o,1 Volumen 1 N NaOH inkubiert und dann mit o,1 Volumen 1 N-HCl plus 1 M Tris HCl Puffer (pH 7,2) neutralisiert. Proben der alkalisch behandelten H,L und gereinigten L Fraktionen sowie ein Gemisch gleicher Mengen alkalisch behandelter H und L Fraktionen wurden 4 Std. in 5-6 M CsCl bei 65°C inkubiert. Die Dichte aller Proben wurde dann auf 1,72o gebracht und 2,5 μg Clostridium perfringens DNA wurde als Referenz DNA (ρ = 1,691) hinzugefügt. Analytische Zentrifugation fand bei 2o°C mit 44.ooo rpm für 2o Std. statt. Grafische Darstellung der U.V.Photographien erfolgte mit einem Joyce-Loebl Mikrodensitometer.

vor dem "annealing" (nach Alkalibehandlung) (Fig.6c), aber 2 Peaks nach "annealing" (Fig.6d); einen Gipfel an der Stelle denaturierter DNA und einen zweiten zwischen denaturierter und renaturierter DNA. Dieser Zwischen-Peak besteht wahrscheinlich aus teilweise ein- und doppelkettigen DNA Molekülen, die durch Bindung intakter L-Ketten mit kontaminierenden H-Kettenfragmenten entstanden. Diese kontaminierenden Fragmente in der L-Ketten-Poly (U,G) Bande konnten durch eine präparative Rezentrifugation entfernt werden. Wie in Fig.6e gezeigt wird, erhält man nach "annealing" dieser Präparation einen einzigen Peak, was wiederum beweist, daß die gereinigte L-Kettenpräparation keine oder nur sehr wenig H-Kette als Kontaminant enthält. "Annealing" von einem Gemisch gleicher Mengen H- und L-Ketten verursacht einen scharfen Gipfel mit einer Dichte nativer DNA (Fig.6f).
Mit Hilfe der präparativen Zentrifugation ist es also möglich, intakte Ad DNA L- und H-Ketten zu isolieren. Der letzte Beweis, daß die DNA Ketten tatsächlich intakt sind, ist schwierig, da isolierte Einzelketten sehr empfindlich gegenüber "shear-breakage" sind (72). Diese Schwierigkeit kann überwunden werden, wenn man während einer Bandzentrifugation gleichzeitig die DNA Kette durch Alkali vom DNA Poly (U,G) Komplex löst. Wie in Fig.7 gezeigt, wird Poly (U,G) vom DNA Ketten-Poly (U,G) Komplex dissoziiert, wenn die Probe auf die alkalische Lösung der Bandzentrifugationszelle geschichtet wird. Während der Zentrifugation sedimentieren die freie L- bzw. H-Kette (Fig.7c und d) in Form von scharf abgesetzten Banden. Die L- und H-Ketten sind intakt, da sie Sedimentationskoeffizienten von 35 S haben (Tab.8). Dieser S-Wert stimmt gut mit dem intakter denaturierter Adenovirus DNA überein (53).

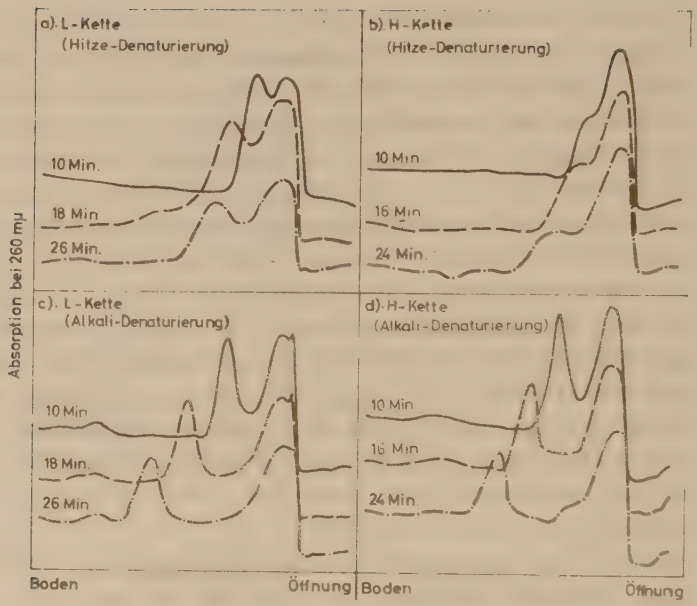

Fig.7. Analytische Bandzentrifugation der H und L Ketten: Ad 2 DNA wurde in Anwesenheit von Poly (U,G) (U:G = 2,3:1); (DNA:Poly(U,G) = 1:1) entweder Hitze- (3 Min., 100°C) oder alkalisch (o,1 Volumen 1 N NaOH) denaturiert und im präparativen CsCl Gradienten zentrifugiert (siehe MATERIAL und METHODEN). Dreißig µl der H und L Gipfel-Fraktionen wurden gegen o,1 x SSC-1o^{-3}M EDTA dialysiert und durch eine alkalische Lösung in einer Bandzentrifugationszelle zentrifugiert, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben. Die U.V. Photographien wurden mit einem Joyce-Loebl Mikrodensitometer grafisch registriert. Drei repräsentative Zentrifugations-Zeiten sind in der Fig. dargestellt: L-Kette nach Hitze-Denaturierung (a) wird mit L-Kette nach alkalischer Denaturierung (c) verglichen; derselbe Vergleich wurde mit den H-Ketten in (b) und (d) gemacht.

Würden die Ad DNA Ketten-Poly (U,G) Komplexe jedoch durch Hitzedenaturierung von Ad DNA gewonnen, dann erhielte man im alkalischen Milieu der Bandzentrifugation zerbrochene L- und H-Ketten (Fig.7a und b), die als breite Banden mit niedrigerem Sedimentationskoeffizienten sedimentierten (Tab.8). Dieser Befund kann möglicherweise mit einer De-

TABELLE 8

Analytische Bandzentrifugation von Ad 2 L- und H-Ketten

Denaturierungs-methode	Kette	$S_{20,W}$	Molekular-gewicht x 10^6
Hitze	H	17,5o	2,oo
Alkali	H	35,53	11,75
Hitze	L	18,o1	2,15
Alkali	L_β	35,53	11,75

AD 2 DNA wurde entweder durch Hitze (3 Min., 1oo°C) oder durch Alkali (o,1 N NaOH) denaturiert und Poly (U,G) wurde, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben, gebunden. Nach präparativer CsCl Dichte-Gradienten Zentrifugation wurden die DNA Ketten-Poly (U,G) Komplexe gegen o,1 x SSC,$1o^{-3}$M EDTA dialysiert. Die Bandzentrifugation wurde in alkalischer Lösung, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben, ausgeführt.

purination der DNA durch Hitzedenaturierung und nachfolgender Fragmentierung in Alkali erklärt werden (73).

V. Hybridisierung viraler RNA mit getrennten Ad 2 DNA Ketten

Wie bereits im Abschnitt "Methodik der Gewebezüchtung" erwähnt, können folgende drei RNA-Arten unterschieden werden:

a) "frühe" RNA, die vor Beginn der viralen DNA Multiplikation synthetisiert wird (12),
b) "späte" RNA, die nach Beginn der viralen DNA Multiplikation gebildet wird (12) und
c) "transformierte" RNA, die in durch Viren transformierten Rattenembryozellen synthetisiert wird.

Zu Beginn wurden Hybridisierungen mit RNA durchgeführt, die von 2-18 Std. nach Beginn der Virusinfektion markiert waren. Diese RNA Präparation besteht deshalb aus "frühen"

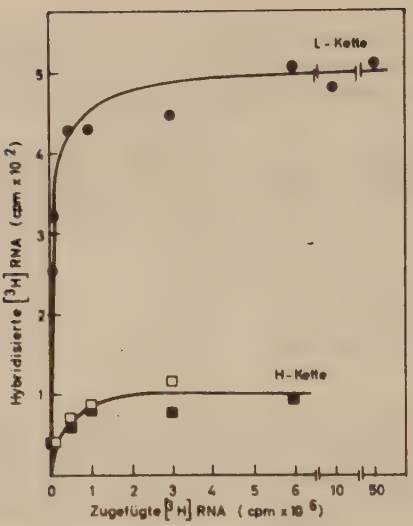

Fig.8. Hybridisierung von Ad 2 H und L DNA Ketten mit gesamter, von 2-18 Std. nach Infektion synthetisierter (^{3}H)-RNA: Filter, die 0,05 µg ^{14}C markierte Ad 2 L oder H Ketten DNA enthielten, wurden 20 Std. bei 67°C mit zunehmenden Mengen "totaler" (^{3}H)-RNA inkubiert. Diese (^{3}H)-RNA wurde aus mit Ad 2 infizierten KB-Zellen, die von 2-18 Std. nach Infektionsanfang mit 1 µC/ml (^{3}H)-Uridin markiert worden waren, extrahiert. Die spezifische Aktivität der (^{3}H)-RNA betrug 20.000 cpm/µg. Mit (^{14}C)-Thymidin markierte DNA wurde in allen Hybridisierungs-Experimenten benutzt, um für die von den Filtern während der Inkubation verlorengegangene DNA zu korrigieren.

und "späten" RNA Molekülen und wird als "totale" RNA bezeichnet. Ad 2 H- oder L-Ketten wurden auf Filtern immobilisiert und mit steigenden Mengen "totaler" RNA hybridisiert. Wie in Fig.8 dargestellt, hybridisiert ca. 80% der "totalen" RNA mit der L-Kette und ca. 20% mit der H-Kette.
Da diese "totale" RNA sowohl "frühe" als auch "späte" RNA enthält, bestand die Möglichkeit, daß eine dieser beiden RNA Arten nur mit der L-Kette, die andere nur mit der H-Kette hybridisierte. Darum wurde 5-^{3}H-Uridin von 17-19 Std. nach Beginn der Infektion KB-Zellen zugefügt, um nur die spät nach Infektionsbeginn gebildete RNA zu markieren. Sät-

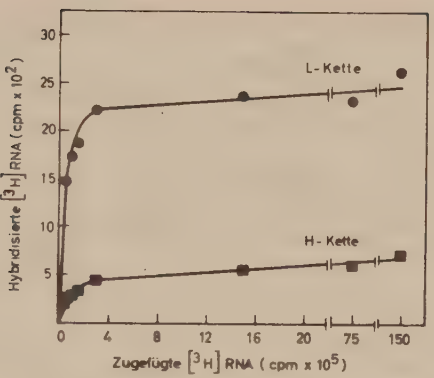

Fig.9. Hybridisierung von Ad 2 H und L DNA Ketten mit "später", von 17-19 Std. markierter, (^{3}H)-RNA: Filter mit o,1 µg Ad 2 L oder H Ketten DNA wurden 2o Std. bei 67°C mit zunehmenden Mengen "später" (^{3}H)-RNA inkubiert. Diese (^{3}H)-RNA wurde aus mit Ad 2 infizierten KB-Zellen, die von 17-19 Std. nach Infektionsanfang mit 5 µC/ml (^{3}H)-Uridin markiert waren, extrahiert. Die spezifische Aktivität der (^{3}H)-RNA betrug 26.ooo cpm/µg.

tigungskurven mit dieser RNA (Fig.9) zeigen die gleiche Verteilung über beide Ketten wie "totale" RNA. Spät nach Infektion wird also ein Fünftel der viralen RNA von der H- und vier Fünftel von der L-Kette abgelesen.
Um zu untersuchen, ob diese Verteilung der Transkription von der H- und L-Kette während des gesamten Infektionszyklus gleich bleibt, wurde mit "früher" RNA hybridisiert. Diese RNA wurde aus Zellen extrahiert, die von 2-6 Std. nach Beginn der Virusinfektion mit 5-^{3}H-Uridin markiert waren.

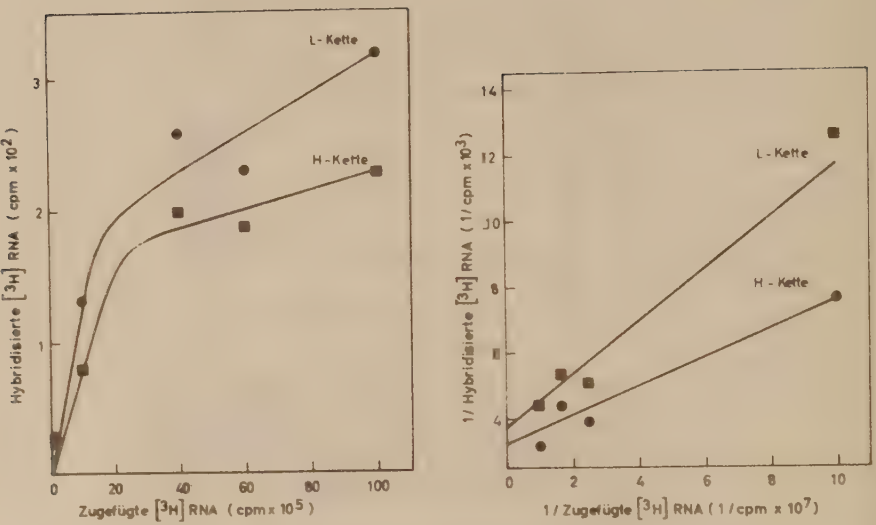

Fig.1o. Hybridisierung von Ad 2 H und L DNA Ketten mit "früher", von 2-6 Std. markierter, (^{3}H)-RNA: a: "Sättigungskurve", b:Doppelreziproke Darstellung. Filter mit o,o5 µg Ad 2 L oder H Ketten DNA wurden 2o Std. bei 67°C mit zunehmenden Mengen "früher" (^{3}H)-RNA inkubiert. Diese (^{3}H)-RNA wurde aus mit Ad 2 infizierten KB-Zellen, die von 2-6 Std. nach Infektionsanfang mit 1 µC/ml markiert waren, extrahiert. Die spezifische Aktivität der RNA betrug 14.ooo cpm/µg.

Die Ergebnisse sind in Fig.1o a dargestellt und zeigen, daß in dem frühen Infektionsstadium (2-6 Stunden) beide Ketten in ungefähr gleichem Maße abgelesen werden. Eine Berechnung der prozentualen Bindung von RNA an die Ketten wird möglich, wenn die zugefügte und die gebundene RNA in doppelreziproker Weise dargestellt werden. Wie in Fig.1o b gezeigt, hybridisiert 39% der "frühen" virusspezifischen RNA mit der L-Kette.

Um zu untersuchen, ob früh im Infektionsprozeß die eine Kette vor der anderen transkribiert wird, wurden DNA Ketten mit RNA hybridisiert, die aus zwei Abschnitten der

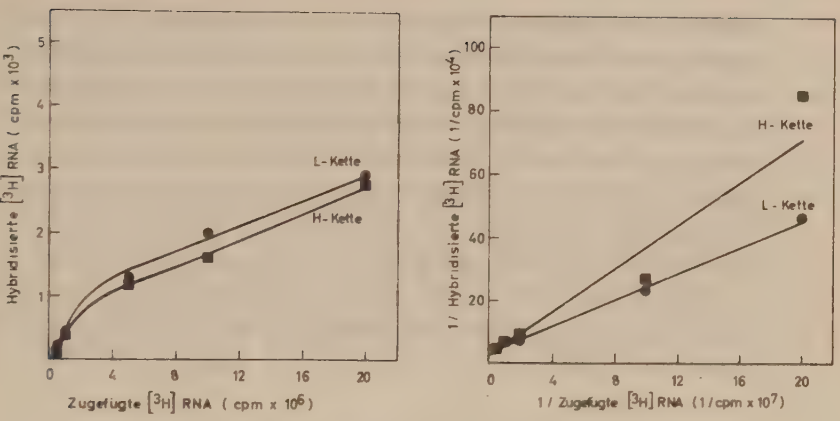

Fig.11. Hybridisierung von Ad 2 H und L DNA Ketten mit "früher", von 2-4 Std. markierter, (^{3}H)-RNA: a: "Sättigungskurve", b: Doppelreziproke Darstellung. Filter mit o,2 µg Ad 2 L oder H Ketten DNA wurden 2o Std. bei 67°C mit zunehmenden Mengen "früher" (^{3}H)-RNA inkubiert. Diese (^{3}H)-RNA wurde aus Zellen, die von 2-4 Std. nach Infektionsanfang mit 1o µC/ml (^{3}H)-Uridin markiert waren, extrahiert. Die spezifische Aktivität der (^{3}H)-RNA betrug 2,6 x 1o^5 cpm/µg.

frühen Infektionsperiode stammten. Zu diesem Zweck wurden zwei RNA Spezies aus KB-Zellen isoliert, die von 2-4 oder von 2-6 Stunden nach Beginn der Infektion markiert wurden. Mit der RNA, die von 2-4 Stunden nach Infektionsbeginn markiert war, konnte keine Sättigung der DNA erreicht werden, da die spezifische Aktivität dieser RNA nicht hoch genug war (Fig.11a). Berechnung mittels doppelreziproker Darstellung ergibt, daß durchschnittlich 41 % der RNA mit der L-Kette hybridisierte (Fig.11b). Beide Abbildungen zeigen deutlich, daß auch in diesem Zeitabschnitt des Infektionszyklus beide DNA Ketten abgelesen werden. Damit ist die Möglichkeit, daß zwei Arten "früher" RNA existieren, wovon die Arten von 2-4 Stunden von der einen und die Spezies von 4-6 Stunden von der anderen DNA Kette abgelesen wird, ausgeschlossen.Die Menge viraler RNA, die kurz nach Infek-

tionsbeginn synthetisiert wird, ist im Vergleich zur Synthese zellulärer RNA sehr klein. Die spezifische Aktivität der viralen RNA ist aus diesen Gründen ebenfalls außerordentlich niedrig. Hybridisierungen mit viraler RNA kürzerer Markierungsperioden in kleineren Abständen vom Infektionsbeginn konnten daher nicht ausgeführt werden. Das Problem der niedrigen spezifischen Aktivität viraler RNA Moleküle bestand auch bei der RNA, die aus transformierten Zellen extrahiert wurde. Deswegen war es unmöglich, DNA Ketten mit zunehmender Menge "transformierter" RNA abzusättigen (Fig.12a). Aber auch hier zeigt sich deutlich,

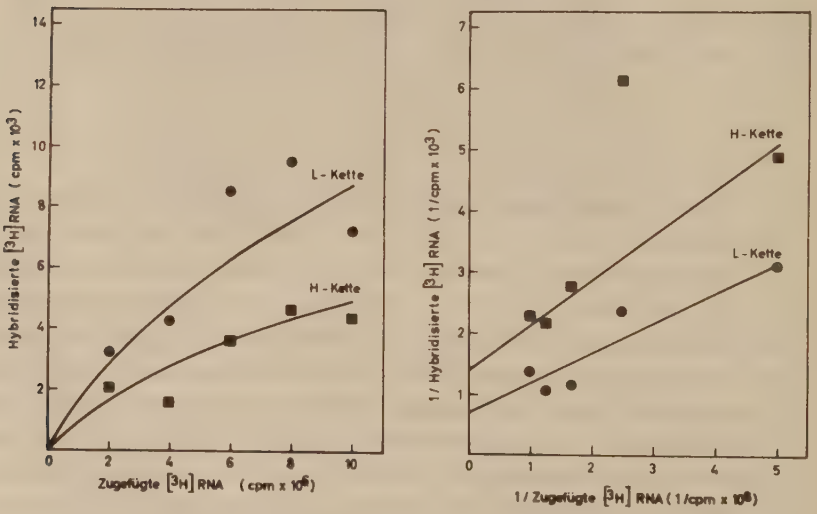

Fig.12. Hybridisierung von Ad 2 H und L DNA Ketten mit "transformierter" (^{3}H)-RNA: a: "Sättigungskurve", b: Doppelreziproke Darstellung. Filter mit 1 µg Ad 2 L oder H Ketten DNA wurden 2o Std. bei 67 C mit zunehmenden Mengen "transformierter" (^{3}H)-RNA inkubiert. Diese "transformierte" (^{3}H)-RNA wurde aus durch Ad 2 transformierten Ratten-Embryo-Zellen, die 8 Std. mit 1o µC/ml (^{3}H)-Uridin markiert waren, isoliert. Die spezifische Aktivität der (^{3}H)-RNA betrug 7,5 x 1o^5 cpm/µg.

daß die viralen RNA's transformierter Zellen Gen-Kopien sowohl der H- wie auch der L-Kette enthalten. In drei unterschiedlichen Experimenten hybridisierte 34, 5o und 5o % der virusspezifischer RNA mit der L-Kette. Dies wurde mittels doppelreziproker Darstellung berechnet (Fig.12b).—

Die Hybridisierung zwischen RNA und einer DNA Kette ist spezifisch. Um das zu beweisen, wurde RNA zuerst mit einer Kette hybridisiert, anschließend eluiert und dann mit der homologen und heterologen Kette rehybridisiert. Die Ergebnisse (Tab.9) zeigen, daß die eluierte RNA vorwiegend

TABELLE 9

Spezifizität der RNA Bindung an getrennte Ad 2 DNA Ketten

RNA Spezies	RNA eluiert von	DNA in zweiter Hybridisierung	Zugefügte RNA (cpm)	Gebundene RNA (% der zugefügten RNA)
"Frühe"	H	H	1385	6,7
	H	L	1385	o,1
	L	H	2715	o,2
	L	L	2715	6,6
"Späte"	H	H	25oo	3,8
	H	L	25oo	o,6
	L	H	12ooo	o,8
	L	L	12ooo	6,4
"Transformierte"	H	H	17oo	31,4
	H	L	17oo	2,6
	L	H	43oo	1,4
	L	L	43oo	36,3

RNA wurde aus KB-Zellen, die von 2-4 Std. ("Frühe") oder von 17-19 Std. ("Späte") nach Infektion mit Ad 2 markiert waren, oder aus 8 Std. lang markierten durch Ad 2 transformierten Ratten-Embryo-Zellen ("Transformierte") extrahiert. Diese RNA wurde mit H- oder L-Ketten hybridisiert, dann bei 8o°C eluiert und anschließend mit der homologen oder heterologen DNA Kette rehybridisiert.

mit der homologen DNA Kette rehybridisierte. Die geringe Kreuzhybridisierung der RNA mit der heterologen Kette kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß die eluierte RNA mit geringen Mengen DNA kontaminiert ist, die sich während der Elution vom Filter gelöst haben.

DISKUSSION

Die DNA's von Ad 2, 7 und 12 besitzen vergleichbare Molekulargewichte und Konformationen, unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrer Basenzusammensetzung und Basenfolge. Die DNA's sind nicht unterbrochene, lineare Duplexmoleküle mit einem Molekulargewicht von 2o-25 x $1o^6$ Daltons (53). Ad 2 DNA hat einen G- + C-Gehalt von 56 %, Ad 7 DNA von 51 % und Ad 12 DNA von 49 % (29). DNA-DNA Homologie-Messungen zeigen, daß sich die Basenfolge in Ad 2, 7 und 12 zu 7o - 9o % unterscheidet (74-76). Adenoviren DNA's zeigen außerdem eine intramolekulare Heterogenität in ihrer Basenzusammensetzung. Dies konnte an Hand breiter thermaler Denaturierungstemperaturen (29) und der Trennung von Halbmolekülen von Ad 2 DNA mittels CsCl Dichtegradienten-Zentrifugation (77) gezeigt werden. In den folgenden Abschnitten werden zuerst weitere Unterschiede dieser drei Adenovirentypen diskutiert:

I. Bindung von Homo-Ribopolymeren an denaturierte Adenovirus-DNA

Poly (G) und Poly (U) binden sich bei pH 7,2 und Poly (C) und Poly (A) bei pH 5,o an denaturierte Ad 2 DNA. Trennung der DNA Ketten konnte nur mit einer durch Alkali-Behandlung verkleinerten Poly (G) erreicht werden. Es scheint also, daß sich die komplementären Ad 2 DNA Ketten in der Zahl ihrer C-Anhäufungen unterscheiden. Ein zu erwartender Unterschied in der Zahl der G-Anhäufungen in den komplementären DNA Ketten konnte nicht gezeigt werden, da Poly (C) unter unseren Bedingungen keine Kettentrennung hervorrief.

II. Bindung von Co-Ribopolymeren an denaturierte Adenovirus-DNA

Wenn Poly (U,G) anstelle von Poly (G) verwendet wurde, nahm die Trennung der viralen DNA Ketten zu. Bestimmte Eigenschaften der Poly (U,G) Präparationen, wie Molekül-Größe,

Konformation und das Verhältnis von U zu G beeinflussen den Grad der Kettentrennung. Poly (U,G) Präparationen der gleichen Größe, aber unterschiedlichem U:G-Verhältnis, rufen unterschiedliche Kettentrennung hervor. Eine mögliche Erklärung ist, daß U die Sekundärstruktur von Poly (U,G) ändert (78) und dadurch eine selektivere Bindung von Poly (U,G) an die DNA Ketten verursacht. Eine andere Möglichkeit wäre die, daß U selbst an dA der DNA gebunden wird. Dafür spricht die Tatsache, daß ein Übermaß Poly (A) die durch Poly (U,G) hervorgerufene Kettentrennung verhindern kann (Tab.6). In diesem Fall müßte eine DNA Kette sowohl dC- als auch dA- oder (dCA)-Anhäufungen enthalten. Das Vorkommen von dA- und dC-reichen Gruppen in einer Kette und dT-reiche Gruppen in der anderen Kette wurde bei Mitochondrien DNA nachgewiesen (79).

III. Vergleich der Bindung verschiedener Poly (U,G) Präparationen an Ad 2, 7 und 12 DNA Moleküle

Beide Ketten von Ad 2, 7 und 12 DNA binden Poly (U,G) in Mengen, die zu Dichtezunahmen von 5o bis 8o mg/cm^3 führen. Ad 2, 7 und 12 DNA Ketten binden Poly (U,G) in unterschiedlichem Maße. Dies ist im Hinblick auf die unterschiedliche Basenzusammensetzung und Basenfolge der drei Adenotypen nicht verwunderlich. Eine Korrelation zwischen der Kapazität der drei viralen DNA's, Poly (U,G) zu binden und dem Grad der Onkogenität der Viren konnte nicht gezeigt werden (Onkogene Kapazität: Ad 12 > Ad 7 > Ad 2;im Vergleich Poly (U,G) Bindungskapazität: Ad 12 DNA > Ad 2 DNA > Ad 7 DNA).

IV. Präparative Trennung der Adenovirus DNA Ketten

Der Dichteunterschied zwischen den komplementären DNA-Poly (U,G) Komplexen war zur präparativen Trennung der Adenovirus DNA Ketten groß genug. Daß tatsächlich intakte komplementäre DNA Ketten isoliert wurden, konnte mittels "Self-Annealing", Bandzentrifugation und Hybridisierung-Eluie-

rung-Rehybridisierung gezeigt werden. Die präparative Trennung der DNA Ketten war zum Studium der viralen DNA Topologie Voraussetzung.

V. Transkription der getrennten Adenovirus 2 DNA Ketten

Ergebnisse in der Literatur über die Transkription getrennter DNA Ketten in Bakterien und Bakteriophagen zeigen, daß vorwiegend die Kette, die am meisten G-enthaltenden Ribopolymer bindet, abgelesen wird. SZYBALSKI u.a. (33,34) haben deshalb vermutet, daß dC-reiche Gruppen auf der DNA eine Rolle beim Beginn der Transkription spielen. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß spät nach Ad 2 Infektion von KB-Zellen die meiste virale RNA von der viralen DNA Kette, die weniger Poly (U,G) bindet, abgelesen wird. Es gibt mehrere Möglichkeiten, diesen Unterschied zwischen unseren Ergebnissen und denen der Literatur zu erklären. Eine Möglichkeit ist, daß spät nach Infektionsbeginn sehr lange Vorstufen von m-RNA-Molekülen synthetisiert werden, die dann in kleinere Moleküle zerbrechen. Zur Synthese dieser langen Moleküle würden dann nur wenige Anfangspunkte (C-Gruppen ?) notwendig sein, was sich in einer geringeren Bindung von Poly (U,G) an die L-Kette zeigt. PARSONS und GREEN (8o) konnten tatsächlich spät nach Infektionsbeginn lange virale RNA-Moleküle mit einem Sedimentations-Koeffizient von 3o S nachweisen. Eine zweite Möglichkeit des anderen Bindungsverhältnisses von Poly (U,G) an virale DNA im Vergleich mit der RNA-Ablesung ist, daß ein wirklicher Unterschied im Transkriptionsanfang zwischen Bakterien und Bakteriophagen RNA einerseits und animaler viraler RNA andererseits besteht.

Unsere Hybridisierungsexperimente bringen eine weitere Klärung der Transkriptionstopologie der Ad 2 DNA, verglichen mit Ergebnissen von FUJINAGA und Mitarbeitern (43). FUJINAGA et al. konnten mit Hilfe DNA-RNA-DNA Hybridisie-

rungen zeigen, daß während produktiver Infektion von KB-Zellen mit Ad 2 80-100 % des viralen Genoms abgelesen wird. Außerdem fanden sie, daß die virale m-RNA, die in durch Ad 2 transformierten Zellen synthetisiert wird, spät nach Infektion von KB-Zellen mit Ad 2 nicht mehr nachweisbar ist (45). Aus diesen Ergebnissen haben sie berechnet, daß spät im Infektionszyklus 90-96 % der viralen Gene abgelesen werden. Die Hybridisierungs-Experimente zwischen "früher" plus "später" RNA (2-18 Std.) und viraler DNA Ketten zeigen, daß die DNA der H- bzw. L-Ketten in einem Verhältnis von 1:4 abgelesen wird. Wenn wir annehmen, daß

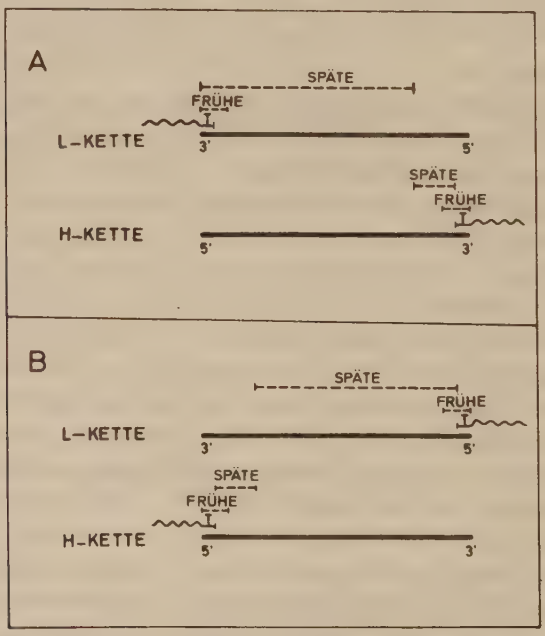

Fig.13. Modelle für die Transcription des Ad 2 Genoms: T bedeutet "transformierte" RNA.

sich die Hybridisierung mit getrennten DNA Ketten in gleicher Weise, wie mit denaturierter DNA vollzieht, so folgt daraus, daß spät nach Infektion 18-2o % der Gene der H-Ketten und 72-76 % der Gene der L-Ketten abgelesen werden (Fig.13).

PARSONS und GREEN (81) konnten zwei "frühe" virale RNA Spezies mit Sedimentierungsgeschwindigkeiten von 22-24 S und 15-17 S und den entsprechenden Molekulargewichten von $1{,}o \times 1o^6$, bzw. $o{,}56 \times 1o^6$ Dalton nachweisen. Vorausgesetzt, daß jede RNA von einer spezifischen Region des Virus-Genoms abgeschrieben wird, dann wurden die zwei "frühen" RNA Spezies von 14-16% des Ad 2 Genoms synthetisiert. Unsere Ergebnisse zeigen, daß "frühe" RNA in ungefähr gleichem Maße mit der H- und der L-Kette hybridisiert. Daraus ergäbe sich, daß früh nach Infektionsbeginn je ca. 8 % der beiden DNA Ketten transkribiert wurde (Fig.13). Zukünftige Hybridisierungsexperimente zwischen den isolierten "frühen" RNA Spezies und den getrennten Ad 2 DNA Ketten werden Aufschluß geben, ob die eine "frühe" RNA von der einen, die andere RNA von der Komplementär-Kette abgelesen wird.

Hybridisierungs-Kompetitions-Experimente mit nicht markierter RNA aus durch Ad 2 transformierten Zellen und markierte "frühe" RNA aus durch Ad 2 infizierten KB-Zellen zeigen, daß 4-1o % des viralen Genoms in den transformierten Zellen abgelesen wird (45). Wegen der geringen spezifischen Aktivität der viralen RNA in den transformierten Zellen, konnte keine Sättigung während der Hybridisierung erreicht werden. Es war somit auch nicht möglich, die genaue prozentuale Verteilung der RNA Transkription von den beiden Ketten zu bestimmen. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß die virale RNA in den durch Ad 2 transformierten Zellen von beiden DNA Ketten abgelesen wird. Dies läßt auf mindestens zwei virale RNA Spezies in den transformierten Zellen schließen (Fig.13). Die virale RNA, die aus transformierten Zellen extrahiert

wurde, zeigt bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine breite Verteilung (82). Diese RNA Moleküle hatten S-Werte bis 45 S und waren in Dimethylsulfoxid stabil. Da in durch Ad 2 transformierten Zellen nur ein kleiner Teil des viralen Genoms abgelesen wird, kann dieser kleine Teil nicht für RNA Moleküle mit 45 S verantwortlich sein. Daraus muß man schließen, daß die RNA, die aus transformierten Zellen extrahiert wird und mit viraler DNA hybridisierbar ist, aus kovalent gebundenen Wirts- und Virus-RNA-Sequenzen bestehen muß. RNA, die zur Verhinderung von Molekülbrüchen sehr sorgfältig aus Ad 2 transformierten Zellen extrahiert wurde, wurde mittels Hybridisierung an Ad 2 DNA und nachfolgender Elution gereinigt. In einer zweiten Hybridisierung formten diese gereinigten, intakten RNA Moleküle sowohl Hybride mit viraler als auch mit zellulärer DNA (83). Damit scheint die Existenz von viralen und zellulären Sequenzen in diesen RNA-Molekülen bewiesen. Wenn man annimmt, daß das ganze Adeno-Genom im zellulären Genom transformierter Zellen inkorporiert ist, so folgt aus unseren Ergebnissen, daß die viralen Gene, von denen die viralen RNA Moleküle in transformierten Zellen abgelesen werden, am Ende der H- und L-Ketten sitzen müssen. Die viralen Gene im Ad 2 Genom, die in transformierten Zellen abgelesen werden, können nicht lokalisiert werden, wenn nur ein Teil des viralen Genoms in der transformierten Zelle inkorporiert wurde oder wenn die Inkorporation des viralen Genoms eine Zirkularisierung mit nachfolgendem intramolekularem Bruch an einer beliebigen Stelle der viralen DNA vorausgeht.

Die in Fig.13 dargestellten Transkriptionsmodelle des Ad 2 Genoms fassen die bisherigen Befunde aus der Literatur und die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zusammen. Aus den Hybridisierungsexperimenten zwischen viralen DNA Ketten und "früher" RNA, bzw. "transformierter" RNA und

Hybridisierungs-Kompetitionsexperimenten mit diesen RNA's würde hervorgehen, daß mehrere "frühe" virale RNA Spezies existieren müssen, von denen zwei identisch sind mit denen in transformierten Zellen.
Im Modell A (Fig.13 A) beginnt die RNA Polymerase an einem zellulären Startpunkt, überliest den Anfang des viralen Genoms und schließt an einem viralen Endpunkt die RNA Synthese ab. In Fig. 13 B wird dargestellt, daß die RNA Polymerase einen viralen Anfangspunkt erkennt, das virale Genom und die anschließenden zellulären Sequenzen abliest und somit erst bei einem zellulären Endpunkt stoppt.
Ein anderes Modell, das die bisherigen Ergebnisse erklären könnte, wäre die Existenz von zwei "frühen" viralen Gen-Promotoren auf der einen und ein dritter Promotor auf der komplementären Kette. In transformierten Zellen würde ein Promotor von jeder Kette funktionieren.
Weitere Studien mit Hilfe von Hybridisierungs-Kompetitionsexperimenten und Hybridisierung mit getrennten RNA Spezies sind notwendig, um diese Transkriptions-Modelle zu beweisen und zu vervollständigen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindung von Homo- und Kopolyribonukleotiden an denaturierte DNA Moleküle der Adenovirus Typen 2, 7 und 12 - drei unterschiedlich onkogene und transformierende humane Virus-Gruppen - wurde mittels analytischer Gleichgewichts-Zentrifugation in CsCl Dichte-Gradienten studiert. Denaturierte Adenovirus 2 DNA bindet Poly (G) und Poly (U) bei pH 7,2 und Poly (C) bei pH 5; Poly (A) wurde jedoch nicht gebunden. Eine ausreichende Trennung der komplementären DNA Kette durch Bindung von Homopolymeren konnte nicht erreicht werden. Kopolyribonukleotid-Präparate von Poly (U,G) mit bekanntem U:G Verhältnis werden von beiden Ketten der Adenovirus 2, 7 und 12 DNA gebunden und führen zu einer Dichtezunahme von 5o bis 8o mg/cm^3. Die beiden komplementären Ketten der Adenovirus 2, 7 und 12 DNA's binden Poly (U,G) in unterschiedlicher Menge. Dies führt zu einem Dichteunterschied von 1o bis 17 mg/cm^3 zwischen den beiden DNA Ketten. Dieser Dichteunterschied macht eine Ketten-Trennung möglich. Die komplementären und intakten DNA Ketten von Ad 2 wurden mittels einem präparativen Verfahren in Form von schweren (H) und leichten (L) DNA-Poly (U,G) Komplexen getrennt. S-Werte von 35 bei der analytischen Bandzentrifugation in Alkali beweisen, daß die Ketten intakt waren. "Self annealing" Experimente und Hybridisation mit Virus-spezifischer RNA zeigten ferner, daß die Ketten nicht mit komplementären Ketten kontaminiert waren.

Mittels DNA-RNA Hybridisations-Experimenten wurde eine Selektion der Ketten während der Transkription des Adenovirus 2 Genoms studiert. Sowohl früh als spät nach produktiver Infektion der humanen KB Zellen mit Ad 2 wurden beide Ketten abgeschrieben. Im frühen Stadium der produktiven Infektion (2-6 Std.) wurden 4o % der Virus-spezifischen RNA von der L-Kette abgeschrieben. Spät nach Infektions-

beginn (17-19 Std.) kam 8o bis 85 % der RNA Sequenzen von der L-Kette. Auch in Virus-freien transformierten Zellen wurden RNA Spezies gefunden, die mit beiden Virus DNA Ketten hybridisierten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Rous,P.: J.Amer.Med.Ass. 56,198 (1911)
2. Epstein,M.A., Achong,B.G. und Barr,Y.M.: The Lancet 1,7o2 (1964)
3. Mitchell,J.R., Anderson,G.R., Bowles,C.A. und Hinz,R.W.: The Lancet 1,1358 (1967)
4. Holland,J.J. und Hoyer,B.H.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27,1o1 (1962)
5. Vainä,T., Saxen,L. und Toivonen,S.: J.Natl.Cancer Inst. 31,1533 (1963)
6. Gerber,P.: Virology 28,5o1 (1966)
7. Koprowski,H., Jensen,F.C., Steplewski,Z.: Proc.Nat.Acad, Sci.U.S. 58,127 (1967)
8. Fujinaga,K. und Green,M.: Proc.Nat.Acad,Sci. 55,1567 (1966)
9. Fujinaga,K. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci. 57,8o6 (1967)
1o. Fujinaga,K. und Green,M.: J.Virol. 1,576 (1967)
11. Fujinaga,K. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci. 64,255 (1969)
12. Fujinaga,K. und Green,M.: J.Mol.Biol. 31,63 (1968)
13. Landau,B.J., Larson,V.M., Devers,G.A. und Hilleman,M.R.: Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 122,1174 (1966)
14. Larson,V.M., Gosnell,P.A. und Hilleman,M.R.: Proc.Soc. Exptl.Biol.Med. 122,1182 (1966)
15. Temin,H.M. und Mizutani,S.: Nature 226,1211 (197o)
16. Baltimore,D.: Nature 226,12o9 (197o)
17. Green,M., Rokutanda,M., Fujinaga,K., Ray,R.K., Rokutanda,H. und Gurgo,C.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 67,385 (197o)
18. Spiegelman,S., Burny,A., Das,M.R., Keydar,J., Schlom,J., Travnicek,M. und Watson,K.: Nature 227,1o29 (197o b)
19. Hatanaka,M., Huebner,R.J. und Gilden, R.V.: Proc.Nat. Acad.Sci.U.S. 67,143 (197o)
2o. Huebner,R.J., Todaro,G.J., Sarma,P., Hartley,J.W., Freeman,A.E., Peters,R.L., Whitmire,C.E., Meier,H.: Proc.Intern.Symp.Tumor Viruses, 2nd, Paris (197o)
21. Huebner,R.J. und Todaro,G.J.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. (im Druck)
22. Schlesinger,R.W.: Advan.Virus Res. 14,1-61 (1969)
23. Trentin,J.J., Yabe,Y. und Taylor,G.: Science 137,835 (1962)

24. Huebner,R.J., Rowe,W.P. und Lane,W.T.:Proc.Nat.Acad. Sci.U.S. 48,2o51 (1962)

25. Pereira,M.S., Pereira,H.G. und Clark,S.K.R.: The Lancet 1,21 (1965)

26. Huebner,R.J., Casey,M.J., Chanock,R.M. und Schell,K.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 54,381 (1965)

27. Girardi,A.J., Hilleman,M.R. und Zwickey,R.E.: Proc.Soc. Exptl.Biol.Med., 115,1141 (1964)

28. Freeman,A.E., Black,P.H., Vanderpool,A.E., Henry,P.H., Austin,J.B. und Huebner,R.J.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 58,12o5 (1967)

29. Pina,M. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 54,547 (1965)

3o. Rosen,L.: Amer.J.Hyg. 71,12o (196o)

31. Szybalski,W., Kubinski,H., Hradecna,Z. und Summers,W.C.: "Methods in Enzymology" Vol.12 "Nucleic Acids", Part C (L.Grossman und K.Moldave,Eds.) Academic Press, New York, 197o

32. Opara-Kubinska,Z., Kubinski,H. und Szybalski,W.: Proc. Nat.Acad.Sci.U.S. 52,923 (1964)

33. Kubinski,H., Opara-Kubinska,Z. und Szybalski,W.: J.Mol.Biol.2o,313 (1966)

34. Szybalski,W., Kubinski,H. und Sheldrick,P.: Cold Spring Harbor Symp.on Quant.Biol. 31,123 (1966)

35. Kubinski,H. und Rose,J.A.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 57,172o (1967)

36. Eagle,H.: Science 13o,432 (1959)

37. Rouse,H.C., Bonifas,V.H. uns Schlesinger,R.W.: Virology 2o,357 (1963)

38. Eagle,H.: Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 89,362 (1955)

39. Sussenbach,J.S.: Virology 33,561 (1967)

4o. Lawrence,W.C. und Ginsberg,H.S.: J.Virol. 1,851 (1967)

41. Philipson,J.: J.Virol. 1,868 (1967)

42. Lonberg-Holm,K. und Philipson,L.: J.Virol. 4,323 (1969)

43. Fujinaga,K., Mak,S. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 6o,959 (1968)

44. Thomas,D.C. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 56,243 (1966)

45. Fujinaga,K. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 65,375 (197o)

46. Green,M.: Virology 18,6o1 (1962)

47. Green,M., Parsons,J.T., Pina,M., Fujinaga,K., Caffier,H. und Landgraf-Leurs,M.: Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol. 35,8o3 (197o)

48. Mak,S. und Green,M.: J.Virol. 2,1o55 (1968)

49. Green,M.: Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 27,219 (1962)

5o. Van der Eb,L.: Dissertation Universität Leiden (1968)

51. Bonifas,V.H. und Schlesinger,R.W.: Federation Proc. 18,56o (1959)

52. Schlesinger,R.W.: "Perspectives in Virology" Vol.II, 69-79 (1961)

53. Green,M., Pina,M. und Kimes,R.: Virology 31,562 (1967)

54. Green,M. und Pina,M.: Virology 2o,199 (1963 a)

55. Burton,K.: Biochem.J. 62,315 (1956)

56. Buell,M.V., Lowry,O.H., Roberts,N.R., Chang,M.W. und Kapphahn,J.J.: J.Biol.Chem. 232,979 (1958)

57. Habich,A., Weissmann,C., Libonati,M. und Warner,R.C.: J.Mol.Biol. 21,255 (1966)

58. Summers,W.C.: Biochem.Biophys.Acta 182,269 (1969)

59. Vinograd,J., Bruner,R., Kent,R. und Weigle,J.: Proc.Nat. Acad.Sci.U.S. 49,9o2 (1963)

6o. Svedberg,T. und Pederson,K.O.: "Die Ultrazentrifuge", Steinkopff,Dresden,Leipzig (194o)

61. Hearst,J.E.: J.Mol.Biol. 4,415 (1962)

62. Studier,F.W.: J.Mol.Biol. 11,373 (1965)

63. Sueoka,N.: J.Mol.Biol. 3,31 (1961)

64. Hradecna,Z. und Szybalski,W.: Virology 32,633 (1967)

65. Gillespie,D. und Spiegelman,S.: J.Mol.Biol. 12,829 (1965)

66. Sherrer,K. und Darnell,J.E.: Biochem.Biophys.Res.Commun. 7,486 (1962)

67. Warner,J.R., Soeira,R., Birnbiom,H.C., Gerard,M. und Darnell,J.E.: J.Mol.Biol. 19,349 (1966)

68. Green,M.: Virology 9,343 (1959)

69. Sheldrick,P. und Szybalski,W.: J.Mol.Biol. 29,217 (1967)

7o. Hartman,K.A. und Rich,A.: J.Am.Chem.Soc. 87,2o34 (1965)

71. Ts'o,P.O.P., Helmkamp,G.K. und Sander,C.: Proc.Nat. Acad.Sci.U.S. 48,686 (1962)

72. Freifelder,D.: Biochem.Biophys.Res.Comm. 29,856 (1967)

73. Studier,F.W.: J.Mol.Biol. 41,189 (1969)

74. Lacy,S. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 52,1o53 (1964)

75. Lacy,S. und Green,M.: Science 15o,1269 (1965)

76. Lacy,S. und Green,M.: J.Gen.Virol. 1,413 (1967)

77. Kimes,R.C. und Green,M.: J.Mol.Biol. 5o,2o3 (197o)

78. Singer,M.F., Jones,O.W. und Nirenberg,M.W.: Proc.Nat. Acad.Sci.U.S. 49,392 (1963)

79. Borst,P. und Ruttenberg,G.J.C.M.: Biochem.Biophys.Acta 19o,291 (1969)

8o. Parsons,J.T., Gardner,J. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 68,557 (1971)

81. Parsons,J.T. und Green,M.: Virology 45,154 (1971)

82. Parsons,J.T.: persönliche Mitteilung

83. Tsuei,D., Fujinaga,K. und Green,M.: Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. (im Druck)

LEBENSLAUF

Am 1o.5.194o wurde ich als Tochter von Martinus Wilhelmus Leurs und Johanna Magtilda Leurs, geborene Goossens, in Weesp, Holland, geboren. Vom September 1946 bis Juli 1951 besuchte ich in Weesp und vom September 1951 bis Juli 1952 in Amsterdam die Volksschule. Im September 1952 trat ich in die Oberrealschule in Amsterdam ein und legte im Juli 1958 das Abitur ab.
Mein Medizinstudium begann ich im Oktober 1958 an der "Gemeentelyke Universiteit van Amsterdam", Holland, legte 1959 das propädeutische Examen, 1961 das "Candidaatsexamen" und 1963 das "Doctoraalexamen" ab. Vom Januar 1964 bis Februar 1966 fand meine klinische Ausbildung statt, mit einer ärztlichen Vorprüfung 1965 und der abschließenden ärztlichen Prüfung im Mai 1966.
Von Anfang 1966 an war ich im "Laboratorium für Mikrobiologie" der Universität Utrecht, im Biochemischen Institut der Universität Amsterdam und im Virus-Labor der Universität Leiden im Rahmen einer Forschungsausbildung tätig. Vom Oktober 1967 bis Oktober 197o arbeitete ich im "Institute for Molecular Virology" der St.Louis Universität in St.Louis/U.S.A. an Problemen der viralen Onkogenese. Aus dieser Arbeit entstand die vorliegende Dissertation.
Seit Januar 1971 bin ich an der II.Med.Klinik der Universität München tätig. Neben einer klinischen Tätigkeit in der Endokrinologischen Ambulanz und auf der Station arbeite ich im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 51 an einem Diabetesforschungsprogramm.
Im Juli 1969 heiratete ich in St.Louis/U.S.A. Dr.med.Rüdiger Landgraf.